

UCH-FC  
Biotecnología

G 111  
C. 1



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

---

**EVALUACIÓN MOLECULAR DEL CARÁCTER AUTÓCTONO  
EN AISLADOS SILVESTRE DE *Saccharomyces  
cerevisiae* PARA USO VITIVINÍCOLA**

**Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero en  
Biotecnología Molecular**

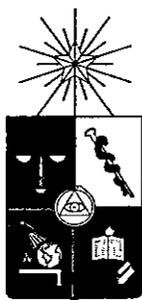
**SOFÍA ANDREA GAC ESPINOZA**

**Director: Dr. Claudio Martínez Fernández**

**Co-directora: Dra. María Angélica Ganga Muñoz**

---

**Santiago, Chile  
2004**



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

---

**EVALUACIÓN MOLECULAR DEL CARÁCTER AUTÓCTONO  
EN AISLADOS SILVESTRE DE *Saccharomyces*  
*cerevisiae* PARA USO VITIVINÍCOLA**

**SOFÍA ANDREA GAC ESPINOZA**

---

**Santiago, Chile  
2004**



**“EVALUACION MOLECULAR DEL CARÁCTER AUTÓCTONO  
EN AISLADOS SILVESTRES DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA  
USO VITIVINÍCOLA”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**SOFÍA ANDREA GAC ESPINOZA**

**Director de Memoria de Título**  
Dr. Claudio Martínez Fernández

Firma manuscrita en azul del Dr. Claudio Martínez Fernández, sobre una línea horizontal.

**Comisión de Evaluación de la Memoria de Título**

Dr. Víctor Cifuentes Gúzman  
Presidente Comisión

Dr. Rubén León Díaz



Firmas manuscritas en azul de los miembros de la Comisión de Evaluación, sobre líneas horizontales.

Santiago de Chile, \_\_\_\_\_ 2004

*A mis padres*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a mi director de tesis, el Dr. Claudio Martínez, por otorgarme la oportunidad y confianza para realizar este hermoso trabajo. Por la disponibilidad, generosidad y paciencia al compartir sus conocimientos y su gran amistad. Gracias por el apoyo.

Quiero agradecer también a mi co-directora, la Dra. Angélica Ganga, por su disposición y confianza otorgada.

Agradezco también a todo el equipo de trabajo del laboratorio, especialmente, a Carolina Carrasco y Berna Rojas, por la ayuda, el apoyo, la motivación, la transmisión de conocimientos y su valorable amistad. A Daniel Garrido, por su ayuda con los datos de RAPD y su buena voluntad.

Quiero agradecer cariñosamente a mi madre, hermanos y amigos, que me alentaron constantemente y me entregaron cariño y soporte emocional.

Finalmente, agradezco el financiamiento otorgado por Fondef D98I1037 a la Dra. Angélica Ganga, gracias al cual este trabajo pudo desarrollarse.

## **TABLA DE CONTENIDOS**

	Página
AGRADECIMIENTOS .....	v
TABLA DE CONTENIDOS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Breve historia del vino .....	2
1.2. Las levaduras en la elaboración del vino .....	4
1.3. Identificación y selección de levaduras vínicas .....	7
1.4. En busca de una levadura vínica autóctonas .....	13
2. HIPÓTESIS	
2.1. Hipótesis de investigación (H <sub>i</sub> ) .....	21
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo general .....	23

3.2. Objetivos específicos .....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1. Cepas .....	25
4.2. Soluciones y medios de cultivo .....	30
4.3. Toma de muestras .....	30
4.4. Extracción del DNA total .....	33
4.5. Digestión del DNA mitocondrial .....	35
4.6. Cariotipo electroforético .....	36
4.7. RAPD .....	37
4.8. Análisis de datos .....	38
5. RESULTADOS	
5.1. Levaduras vínicas recolectadas en Chile .....	41
5.2. Digestión del DNA mitocondrial .....	47
5.3. Análisis de los datos de RFLP del DNA mitocondrial .....	50
5.4. Cariotipo electroforético .....	56
5.5. RAPD-PCR .....	69
6. DISCUSIÓN	
6.1. Diversidad de cepas vínicas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en	

Chile .....	80
6.2. Marcadores genéticos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a nivel intraespecífico .....	83
6.3. Validez de los datos de polimorfismo para determinar la relación genética de cepas vínicas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de distintos orígenes .....	90
6.4. Carácter autóctono de cepas vínicas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en Chile .....	99
7. CONCLUSIONES .....	103
8. REFERENCIAS .....	106
ANEXOS	
ANEXO 1: Soluciones y medios .....	117
ANEXO 2: Tabla de distancias digestión DNA mitocondrial .....	CD-R
ANEXO 3: Tabla de distancias cariotipo electroforético .....	CD-R
ANEXO 4: Tabla de distancias RAPD .....	CD-R

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Mapa de la región vitivinícola del valle central de Chile	42
FIGURA 2: Digestión del mtDNA de aislados <i>S. cerevisiae</i> .....	49
FIGURA 3: Dendrogramas con UPGMA elaborados con los datos de distancia genética del análisis de los perfiles de restricción del mtDNA con <i>Hinf</i> I de 10 cepas de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> obtenidos con distintos coeficientes matemáticos .....	51
FIGURA 4: Dendrograma basado en los perfiles de restricción del mtDNA de 299 aislados de <i>S. cerevisiae</i> según el método UPGMA .....	53
FIGURA 5: Perfiles de restricción del mtDNA .....	55
FIGURA 6: Cariotipo electroforético por campo pulsado de aislados <i>S. cerevisiae</i> .....	58
FIGURA 7: Cepas no- <i>Saccharomyces</i> detectadas por análisis de cariotipo electroforético .....	60
FIGURA 8: Dendrograma basado en los patrones de cariotipo electroforético de 152 aislados <i>S. cerevisiae</i> según el método UPGMA .....	63

FIGURA 9: Comparación de tres cepas que presentan cariotipo electroforético similares y perfiles de restricción del mtDNA distintos .....	64
FIGURA 10: Aislados de levadura con sus perfiles de restricción del mtDNA y de cariotipo electroforéticos idénticos .....	65
FIGURA 11: Aislados con cariotipos electroforéticos idénticos, pero no idénticos en el dendrograma .....	66
FIGURA 12: Dendrograma basado en los patrones de cariotipo electroforético de 99 aislados <i>S. cerevisiae</i> según el método UPGMA .....	68
FIGURA 13: Análisis de RAPD a cepas <i>S. cerevisiae</i> .....	73
FIGURA 14: Dendrograma basado en los análisis de RAPD de 47 cepas <i>S. cerevisiae</i> según el método UPGMA .....	74
FIGURA 15: Dendrograma basado en los patrones de cariotipo electroforético de las 47 cepas <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en análisis de RAPD, según el método UPGMA .....	76
FIGURA 16: Dendrograma basado en los perfiles de restricción de mtDNA de 46 cepas <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en análisis de RAPD, según el método UPGMA .....	77

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1: Cepas de levaduras utilizadas en este estudio .....	27
TABLA 2: Preselección de los aislados de levaduras <i>S. cerevisiae</i> recolectados en Chile en los valles del Maipo, Curicó y Maule .....	43
TABLA 3: Diversidad de cepas <i>S. cerevisiae</i> según sus perfiles de restricción del mtDNA en los valles de Curicó y Maule .....	46
TABLA 4: Diversidad de cepas <i>S. cerevisiae</i> según sus perfiles de restricción de mtDNA en áreas de recolección industrializadas del valle de Curicó y no industrializadas del valle del Maule .....	46
TABLA 5: Cantidad de levaduras vínicas <i>S. cerevisiae</i> analizadas por digestión del mtDNA .....	48
TABLA 6: Cantidad de levaduras vínicas <i>S. cerevisiae</i> sometidas a electroforesis de campo pulsado .....	57
TABLA 7: Análisis de PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS del rDNA cuyo cariotipo electroforético no corresponde a la especie <i>S. cerevisiae</i> .....	61

TABLA 8:	Partidores utilizados para el análisis de RAPD y sus secuencias nucleotídicas correspondientes .....	70
TABLA 9:	Cantidad de levaduras analizadas por RAPD .....	71

## RESUMEN

Las levaduras vínicas autóctonas estarían adaptadas a las condiciones climáticas, de sustrato y de fermentación de su lugar de origen, por lo que su selección permitiría elaborar vinos de calidad, reproducibles y característicos de la región. En este trabajo se evaluó la capacidad de las técnicas de digestión del mtDNA, cariotipo electroforético y RAPD para establecer el carácter autóctono de cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas en tres subregiones vitivinícolas de Chile: valles del Maipo, Curicó y Maule. Para esto, se comparó la similitud de sus patrones electroforéticos con el de cepas provenientes desde España, Perú, Uruguay y cepas comerciales de uso común en diversas regiones vitivinícolas del mundo, mediante el coeficiente de similitud de Dice. El elevado polimorfismo obtenido por restricción del mtDNA y cariotipo electroforético permitieron diferenciar las cepas *S. cerevisiae*; sin embargo, no se obtuvo una clara correlación con su origen geográfico. Por su parte, el método de RAPD permitió diferenciar las cepas de *S. cerevisiae* analizadas y obtener correspondencia entre la relación genética de éstas y su origen geográfico. Así, se determinó el carácter autóctono de varias cepas aisladas en Chile, resaltando 6 cepas agrupadas dentro de un clúster separado tanto en RAPD como cariotipo electroforético. Además, se pudo establecer el carácter no autóctono de una cepa comercial aislada en el valle de Casablanca, Chile.

## ABSTRACT

Autochthonous wine yeasts adapt to the climatic, substrate and fermentation conditions of their place of origin. The selection of such yeasts would allow elaborating high quality, reproducible and typical wines of a region. In this work we evaluated three DNA fingerprinting technologies: the capability of the mtDNA restriction, electrophoretic karyotyping and RAPD, to evaluate the autochthonous character of wine yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated in three wine sub-region of Chile: Maipo, Curico and Maule valleys. The similarity of their electrophoretic profiles were compared with strains isolated from Spain, Peru, Uruguay and commercial strains commonly used in several wine regions of the world, applying the Dice similarity coefficient. The high polymorphism obtained by mtDNA restriction and electrophoretic karyotype allowed to differentiate strains of *S. cerevisiae*; however, a strong correlation with their geographical origin was not clear. On the other hand, RAPD's analysis allowed differentiating strains of *S. cerevisiae* and to obtain a good correspondence among strains genetic relationships and their geographical origins. Applying these techniques, the autochthonous character of several strains isolated in Chile was determined and 6 strains stood out. Those strains contained separate cluster so much by RAPD as by karyotyping analysis. Also, our experimental analysis established the non autochthonous character of a commercial wine yeast strain isolated recently in the Casablanca valley, Chile.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. Breve historia del vino**

Las primeras actividades agrícolas habrían comenzado 6000 años a.C., pero no es hasta dos milenios después que en el Próximo Oriente, Mesopotamia y Egipto, se instala la vida sedentaria y se pasa a pequeñas unidades de producción de carácter estatal. Por esta época se iniciaría la elaboración de bebidas y otros productos fermentados. Se sabe que durante la Antigüedad el alimento de mayor consumo era el pan y sus derivados y que entre las bebidas preferidas destacaban la cerveza y el vino (Artehistoria, 2002).

De este modo, la elaboración del vino habría surgido 3000 a 4000 años a.C. en el fértil valle del Nilo, donde los egipcios sembraban las vides y cosechaban luego su fruto para preparar deliciosos caldos. Pronto el vino se difundió por Grecia, donde las innovadoras técnicas de conservación alcanzaron gran reconocimiento, y China, quienes regularon su elaboración y mercadeo. Al llegar a la Península Ibérica los romanos lo extendieron por todo su imperio.

La comercialización entre comunidades provocó la difusión de su elaboración y consumo, propagándose a nivel social y geográfico. Diversas culturas a través del tiempo han adoptado el vino, y otras bebidas de frutos fermentados, como parte de ritos y celebraciones, presentándose en la medicina y la economía, en religiones a favor y en

contra, en diversas manifestaciones de arte y motivando también su investigación (Gómez, [s.a.]).

En América la elaboración de bebidas fermentadas era principalmente en base a maíz. Al llegar los españoles se percataron de la ausencia de varios alimentos básicos para ellos, entre los cuales estaba el vino de uva. Como la navegación era dificultosa y las cantidades se hacían insuficientes, sobre todo cuando comenzaron las misiones religiosas y se requería del vino sacramental, decidieron comenzar a traer las vides y cultivarlas donde las condiciones parecían propicias para su implantación y desarrollo (Vinos de Argentina, 1999).

En Chile las primeras vides llegaron durante la segunda mitad del siglo XVI, no se tiene certeza si provenientes de Perú o si fueron traídas por Pedro de Valdivia y Diego de Almagro directamente desde España. Pero es en el norte del país donde se plantaron los primeros viñedos, siendo don Francisco de Aguirre el primer viticultor chileno. Durante el siglo XVII el cultivo de la vid y la producción de vinos aumentaron de manera notable, tanto que la corona española prohibió que se realizaran nuevas plantaciones de viñedos y aplicó impuestos para su mantención, los cuales no fueron levantados hasta 1678. Sin embargo, la base de la vitivinicultura moderna comienza en Chile en 1851, cuando don Silvestre de Ochagavía trae las más finas cepas viníferas francesas (Chilevinos, 1996a; Veramonte, [s.a.]).

Es indiscutible que el clima templado mediterráneo de Chile, con luminosidad y suelos adecuados para el cultivo de la uva, junto con la extraordinaria configuración geográfica, que aísla y protege naturalmente por los cuatro puntos cardinales, las zonas vitivinícolas de fenómenos climáticos y plagas, son elementos cruciales en la buena adaptación y proliferación de la vid (Chilevinos, 1996b). Estos factores climáticos y geográficos, junto con las inversiones técnico-empresariales realizadas en esta actividad, han permitido que nuestro país sea actualmente uno de los principales productores de vinos del nuevo mundo.

## **1.2. Las levaduras en la elaboración del vino**

A pesar de la preocupación de los diversos pueblos por mejorar la elaboración y conservación del vino, el proceso que lleva a cabo la transformación del jugo de fruta en una bebida alcohólica era desconocido y científicamente inexplicable, se creía que era un regalo de los dioses o que era producto de la descomposición espontánea de las frutas. Si bien Antonie van Leeuwenhoek fue el primero en observar la presencia de microorganismos en la fermentación de la cerveza hacia 1680, no fue sino 200 años después, durante la segunda mitad del siglo XIX, cuando Louis Pasteur demostró que la fermentación era producto de la naturaleza viva de los fermentos, pequeños organismos

capaces de vivir en condiciones de falta de oxígeno y transformar el jugo sacarino de las frutas en etanol y dióxido de carbono. Se descubrió así que los microorganismos responsables de la fermentación alcohólica en el proceso de vinificación eran levaduras, nombre genérico con que se agrupa a una variedad de hongos unicelulares, y que éstas se encontraban también en otros productos fermentados, como el pan y la cerveza (Feldmann, 2001; Pasteur, 1879).

A partir de este descubrimiento se entendió que el vino es un producto complejo, cuya calidad depende de variados factores, como agentes químicos y físicos que inciden sobre la fermentación (Collado, 2001; Mesas y Alegre, 1999), la variedad de la vid (Schütz y Gafner, 1994), las condiciones climáticas (Longo y cols., 1991) y de los microorganismos que llevan a cabo la fermentación y producen metabolitos enriquecedores de su perfil organoléptico.

Los estudios dirigidos a conocer la dinámica poblacional de la microbiota que se desarrolla durante la vinificación han sido de real importancia para la identificación de los microorganismos implicados en este proceso, así como su influencia en la calidad del vino. Actualmente, sabemos que las levaduras que se encuentran en la piel de la uva pasan al mosto durante las operaciones enológicas de estrujado y prensado del grano. De esta manera, a partir de una materia prima no estéril comienza a desencadenarse la fermentación del mosto de uva en forma natural y espontánea, interviniendo un gran

número de especies de levaduras, algunas de las cuales coexisten en el tiempo y otras se suceden secuencialmente en función de las condiciones del medio. En el mosto de uva y durante la fase temprana de la fermentación espontánea dominan levaduras oxidativas, con baja actividad fermentativa, resistentes a altas concentraciones de glucosa y sensibles al etanol, como las pertenecientes a los géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, y *Metschnikowia*, que además se caracterizan por producir compuestos secundarios enriquecedores del sabor y aroma del vino, como glicerol, acetoina, ácido acético y ácido láctico. A medida que se va consumiendo el oxígeno y aumenta la producción de etanol comienzan a predominar las levaduras de mayor capacidad fermentativa. Cuando la concentración de etanol se eleva sobre el 4 % v/v resisten principalmente las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* y, particularmente, la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura domina la mayor parte de la fermentación alcohólica y, habitualmente, es inhibida cuando el vino alcanza 13 - 14 % v/v de alcohol (Collado, 2001; Fernández y cols., 1999; Povhe Jemec y cols., 2001).

De esta forma, *S. cerevisiae* es fundamental en la elaboración del vino y también una de las levaduras más importantes para el hombre, pues además de ser el microorganismo eucarionte más estudiado, ya que posee grandes ventajas para la investigación que se han ido haciendo evidentes conforme se han desarrollado nuevos enfoques y métodos de estudio, es la levadura más aprovechada industrialmente en la elaboración de alimentos fermentados (González y Valenzuela, 2002).

### 1.3. Identificación y selección de levaduras vínicas

Muchas viñas en todo el mundo recurren actualmente a la adición de levaduras al mosto con el objetivo de conducir la fermentación. Esto puede realizarse preparando lo que se llama pie de cuba, en que se inocula el mosto con una pequeña fracción de la propia vendimia utilizando uvas sanas que se han dejado alcanzar plena fermentación. En este caso, se aumenta la concentración celular de levaduras presentes en el mosto y tiene como fin evitar el retardo en el inicio de la fermentación (disminuir la fase de latencia). También se puede inocular el mosto con levaduras secas activas que, generalmente, pertenecen a las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus*. Cada cepa de levadura usada como cultivo iniciador de la fermentación posee cualidades distintivas, unas se caracterizan por poseer un elevado poder fermentativo, otras son más resistentes al alcohol o la temperatura, etc. (Mesas y Alegre, 1999). La adición de estas levaduras comerciales permite utilizar siempre una misma cepa de características adecuadas al tipo de uva o condiciones del vino deseadas, asegurando una buena fermentación y reproducibilidad en el tiempo, sin impedir que las levaduras presentes en los primeros estados de fermentación influyan sobre las características organolépticas del vino final (Querol y cols., 1992c).

Así, la investigación sobre microorganismos vínicos se centra hoy en desarrollar nuevas técnicas de identificación microbiana y en diseñar cultivos iniciadores,

seleccionando y mejorando cepas enológicas. La identificación de levaduras vínicas puede permitir conocer la diversidad de la microbiota natural presente en un mosto de uva y su desarrollo durante la fermentación, diferenciar las distintas cepas de levaduras dentro de una especie y garantizar la imposición de la levadura inoculada.

Existen varios métodos de identificación de levaduras de interés enológico. Los métodos microbiológicos convencionales basados en caracteres morfológicos, sexuales y metabólicos permiten una identificación a nivel de género o especie (Fernández y cols., 1999), pero son muy laboriosos y pueden depender de las condiciones fisiológicas de las células o de leves variaciones en los medios de cultivo. En las últimas décadas, los avances de la biología molecular han permitido desarrollar nuevas técnicas de identificación basadas en caracteres moleculares, simplificando la identificación y eliminando las ambigüedades. Estas nuevas técnicas incluyen, por ejemplo, hibridación del DNA (Querol y cols., 1992a), análisis de polimorfismo por PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa) (Baleiras Couto y cols., 1996; de Barros Lopes y cols., Fernández y cols., 1999; 1998; Pérez y cols., 2001), análisis de los patrones electroforéticos de proteínas (Guillamón y cols., 1993; Izquierdo y cols., 1996; Querol y cols., 1992a), análisis de los perfiles de restricción del DNA mitocondrial (mtDNA) (Belloch y cols., 1997; Guillamón y cols., 1994; Querol y cols., 1992c) y análisis del cariotipo electroforético (Benítez y cols., 1996; Briones y cols., 1996; Zolan, 1995).

Un sistema para la diferenciación eficaz entre géneros y especies distintas se basa en el análisis de los polimorfismos en el DNA ribosomal (rDNA) (Cadez y cols., 2002; Esteve-Zarzoso, 1999). Esta técnica aprovecha zonas muy poco conservadas del DNA que se denominan ITS (del inglés *Internal Transcribed Spacers*, secuencias internas transcritas), las cuales se encuentran entre las secuencias que codifican para los diferentes RNA ribosomales (rRNA), que sí son muy conservadas entre distintas especies, géneros e incluso familias y órdenes diferentes. Las medidas obtenidas por la amplificación de los ITS mediante la técnica de PCR y de los fragmentos que resultan de su digestión con diferentes enzimas de restricción, RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), son los que permiten distinguir entre levaduras de diferentes géneros o diferentes especies de un género (Carro y Piña, 2000).

Sin embargo, es necesaria la identificación de diferentes cepas de levaduras dentro de la especie *S. cerevisiae*, que es la principal responsable de la transformación del mosto de uva en vino, ya que sus variedades pueden tener propiedades muy diferentes en sus aptitudes fermentativas y organolépticas. Diversos estudios han demostrado que el análisis del mtDNA, del cariotipo electroforético y de RAPD (del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*, amplificación aleatoria de DNA polimórfico) son opciones que permiten una buena diferenciación intraespecífica para *S. cerevisiae* (Baleiras Couto y cols., 1996; Benítez y cols., 1996; Querol y cols., 1992a).

La técnica del mtDNA es posiblemente la más sencilla para distinguir cepas de levaduras vínicas de *S. cerevisiae*. El mtDNA de levadura es una molécula circular de unos 75 kb y cada célula puede contener hasta 35 copias, representando así alrededor del 15 % del DNA total (Bouix y Leveau, 2000; Broach y cols., 1991). Además, presenta una gran variabilidad de secuencia, lo cual lo convierte en un instrumento valioso para la identificación de cepas de levadura, ya que al realizar digestiones enzimáticas del mtDNA se producen fragmentos de tamaños discretos (RFLP de mtDNA) que varían entre los diferentes géneros de levaduras, entre las diferentes especies de *Saccharomyces* y entre diferentes cepas de *S. cerevisiae* (Carro y Piña, 2000). Querol y cols. (1992a) desarrollaron un método que aprovecha el bajo contenido GC del mtDNA de *S. cerevisiae* (alrededor de 18 % de GC) y su extrema subdivisión en regiones ricas en GC y ricas en AT (Broach y cols., 1991). Utilizando enzimas de restricción que reconocen secuencias de DNA del tipo G<sub>1</sub>C<sub>1</sub>A<sub>1</sub>T<sub>1</sub> (ej.: *Hinf*I: G/ANTC; *Eco*RV: GAT/ATC; *Rsa*I: GT/AC) se produce una completa digestión del DNA nuclear, pues éste posee múltiples sitios de restricción para ellas, mientras que en el mtDNA los pocos puntos de corte generan fragmentos discretos que pueden ser correctamente separados y visualizados por electroforesis. La elección adecuada de la enzima de restricción permite obtener la mejor diferenciación dentro de la especie (Querol y cols., 1992a).

El análisis de RAPD es una técnica que, tal como su nombre indica, se basa en el análisis del DNA genómico por medio de PCR usando partidores aleatorios (Carro y

Piña, 2000). El patrón de bandas electroforéticas generado presenta fragmentos de DNA que son compartidos por un grupo de genotipos, estando ausentes en otros. De esta forma, este tipo de polimorfismo genético permite desarrollar marcadores moleculares para la identificación de individuos, la diferenciación de especies o cepas y realizar estudios de genética de poblaciones (Baleiras Couto y cols., 1996; Pérez y cols., 2001; Riveros y cols., 2001). Esta técnica es muy utilizada especialmente en estudios sobre identificación y relación filogenética de hongos infecciosos (Clemons y cols., 1997; Chatellier y cols., 1999; Lin y cols., 1996; Wang y cols., 1998).

El genoma de *S. cerevisiae*, cuya total secuenciación fue concluida en 1996, contiene alrededor de 12 Mb en su dotación haploide repartidos en 16 cromosomas que oscilan entre 150 y 2200 kb (Bouix y Leveau, 2000; González y Valenzuela, 2002). La visualización de los cromosomas por electroforesis de campo pulsado (ECP) recibe el nombre de cariotipo electroforético y es una potente herramienta que permite distinguir diferentes especies del género *Saccharomyces* y distintas cepas de las poblaciones naturales de *S. cerevisiae* provenientes del mosto, las cuales exhiben un elevado polimorfismo cariotípico (Carro y Piña, 2000). La ECP se basa en la separación de grandes moléculas de DNA (sobre 50 kb) mediante pulsos de campos eléctricos que se alternan periódicamente. Mediante la hibridación con sondas asignadas para cada cromosoma y utilizando diferentes condiciones de electroforesis se verificó que las bandas obtenidas por este método corresponden a cromosomas intactos (Schwartz y

Cantor, 1984). La separación adecuada de los cromosomas depende de las condiciones de electroforesis a las que son sometidos. Este polimorfismo cromosomal se debe a variaciones en los tamaños y número de los cromosomas por recombinaciones que pueden ocurrir tanto por procesos meióticos o mitóticos y que se observan por ECP como variaciones en el número y posición de las bandas cromosomales. Los mecanismos por los que se producen estos rearrreglos cromosómicos pueden ser eventos intra o intercromosomales (deleciones, inserciones, traslocaciones, etc.) y las consecuencias de su acumulación pueden ir desde cambios metabólicos y morfológicos hasta especiación (Fischer y cols., 2000; Nadal y cols., 1999; Ono e Ishino-Arao, 1998; Puig y cols., 2000).

Por otro lado, países como Francia, España y Estados Unidos han creado en las últimas décadas cultivos iniciadores de levaduras enológicas con fines industriales. Como ya se dijo, esto implica la selección de cepas principalmente de *S. cerevisiae* con características enológicas deseables, tales como alto poder fermentativo, resistencia a factores de estrés (etanol, pH ácido, anhídrido sulfuroso, etc.), y otras características particulares para aplicaciones concretas, con el fin de obtener un producto de calidad conocida y reproducible en el tiempo.

Pese a que Chile es un país con factores privilegiados para la producción vitivinícola, donde la industria del vino ha experimentado en los últimos años un gran

crecimiento y posicionamiento en los mercados extranjeros, con exportaciones que han aumentado de 430.500 hectolitros en 1990 a 2.647.499 hectolitros en el 2000 e ingresos ese mismo año de 568,9 millones de dólares americanos (Chilevinos, 2001; Costa, 2001), la investigación en microbiología enológica es escasa. No existen estudios exhaustivos acerca de la composición de la microbiota natural presente en nuestras viñas, de las cepas *S. cerevisiae* y su capacidad fermentativa y organoléptica. Además, son escasos los estudios destinados a la creación de cultivos iniciadores o al diseño de cepas mejoradas genéticamente.

#### **1.4. En busca de una levadura vínica autóctona**

Los consumidores de hoy tienen un mayor entendimiento del valor y calidad del producto y esperan que el vino de una región en particular posea cualidades únicas que lo diferencien de otros vinos de la misma variedad, pero de otras regiones. Una posibilidad para lograr esta diferenciación es seleccionando levaduras vínicas autóctonas, es decir, levaduras aisladas desde una región vitivinícola particular y cuyo parentesco con cepas comerciales o de otras regiones del mundo sea lejano.

Mediante las técnicas de biología molecular antes mencionadas, varios autores (Frezier y Dubourdieu, 1992; Querol y cols., 1992b; Schütz y Gafner, 1994; Vezinhet y

cols., 1992) han encontrado cepas representativas de una determinada región vitivinícola y han caracterizado cepas nativas locales (aisladas en el mismo lugar de producción) que generan vinos de muy buena calidad. Estos estudios se basan en que las cepas que han estado presentes desde hace tiempo en los viñedos de una región estarían mejor adaptadas a las condiciones climáticas, de variedad de uva y de fermentación utilizadas en dicha región, por lo que actualmente se busca seleccionar cepas vínicas autóctonas (en general, de zonas vitivinícolas con procesos de vinificación tradicional) para conducir las fermentaciones de los mostos de esa misma región y así producir vinos de buena calidad y con propiedades sensoriales distintivas según su origen.

Para esta selección se requiere determinar, junto a los criterios de interés enológico como producción del factor *killer*, perfil de fermentación y análisis sensorial de los vinos producidos, que estas cepas silvestres sean realmente autóctonas. En este sentido, es importante destacar que usualmente las cepas aisladas desde la naturaleza se denominan cepas silvestres o nativas, pero la denominación de cepa autóctona tiene para este estudio otra connotación. En este sentido, la diferencia radica en que las cepas nativas corresponden a levaduras que se encuentran en una determinada área aún cuando estas hayan arribado recientemente a dicha área. Por el contrario, una cepa autóctona implica que ella ha sido originada por cepas que han pertenecido por mucho tiempo a dicho lugar.



La importancia de realizar esta diferenciación se debe a que la práctica de añadir levaduras secas activas al inicio de la fermentación en la gran mayoría de las viñas chilenas en las últimas décadas, sumado a sistemas no controlados de tratamiento de los desechos de la vinificación, donde estos generalmente se devuelven a la naturaleza, favorece que las levaduras comerciales introducidas se implanten en las instalaciones de las viñas, sean diseminadas en las localidades donde ellas son profusamente utilizadas y que inclusive desplacen a las poblaciones de levaduras autóctonas. Por esto, al recolectar levaduras desde los viñedos o desde fermentaciones con mostos naturales se podrían aislar levaduras comerciales utilizadas en dicha zona vitivinícola. Se debe ser cuidadoso para, de esta manera, evitar seleccionar y utilizar como cultivo iniciador, e incluso luego comercializar, cepas silvestres que son idénticas o derivados recientes de las cepas comerciales ya utilizadas masivamente.

Los estudios que se han realizado para la selección de cepas vnicas nativas, no incluyen cepas silvestres y comerciales aisladas en distintas regiones vitivinícolas del mundo para su comparación. Tampoco validan la autoctonía de sus cepas, lo que es importante de demostrar, sobre todo cuando no existe un control sobre la eliminación de los desechos de la vinificación y existen zonas de uso profuso de cepas comerciales.

Aunque las bases del elevado polimorfismo observado en los genomas nuclear y mitocondrial de las cepas vnicas de *S. cerevisiae* no están claras, se ha sugerido que éste

se produciría debido a la constante adaptación de estas levaduras al ambiente industrial (Codón y cols., 1998; Ibeas y Jiménez, 1996; Pérez-Ortín y cols., 2002). La presencia de cepas de *S. cerevisiae* representativas de una región vitivinícola ha llevado a concluir que existe cierta correlación entre la distancia genética derivada de patrones electroforéticos y el origen geográfico y/o ecológico de cepas vínicas de *S. cerevisiae* (Izquierdo y cols., 1996 y 1997; Guillamón y cols., 1996; Nadal y cols., 1996). Por esto, el hecho que Chile tenga al desierto de Atacama por el norte, la cordillera de los Andes por el este, el océano Pacífico por el oeste y los hielos patagónicos por el sur, permite suponer que existe un aislamiento geográfico entre las cepas autóctonas de Chile y aquellas provenientes de otros países, lo cual debiera reflejarse en menores distancias genéticas entre las cepas autóctonas de Chile que entre éstas y aquellas cepas aisladas en otros países.

De esta forma, si comparamos las cepas aisladas en zonas vitivinícolas de Chile, con las de otros países y con las cepas comerciales más frecuentemente utilizadas en nuestro país, podríamos determinar si existe una diferenciación según su origen geográfico, si aislados silvestres colectados en Chile son o no cepas comerciales y, de este modo, determinar la presencia o ausencia de cepas autóctonas en nuestro país.

La búsqueda de una metodología apropiada, que ojalá sea sencilla, confiable, rápida y de bajo costo para la diferenciación de cepas vínicas de *S. cerevisiae* que

permita a su vez una asociación con la distancia genética entre ellas es muy importante. La utilización de técnicas basadas en la posición de bandas electroforéticas, que reflejan el genotipo de las cepas, podrían permitir determinar el grado de relación entre las distintas cepas a partir de la similitud entre sus perfiles electroforéticos.

En este tipo de análisis los datos binarios 1 y 0 describen la presencia y ausencia, respectivamente, de una banda en una posición particular del patrón. Así, la comparación entre los perfiles electroforéticos puede otorgar cuatro valores:

		Muestra $j$	
		1	0
Muestra $i$	1	a	b
	0	c	d

donde el valor a es el número de bandas comunes para ambas muestras, b es el número de bandas que posee  $i$  pero no  $j$ , c es el número de bandas que posee  $j$  pero no  $i$  y d es el número de bandas ausentes en ambas muestras. Comúnmente cuando se tienen datos binarios los análisis microbiológicos utilizan los coeficientes matemáticos de Dice, Jaccard y de concordancia simple para determinar la similitud entre muestras

(Mäntynen, 1999). Las fórmulas matemáticas de estos coeficientes están definidas a continuación según los valores de comparación entre las muestras, así:

$$\text{Coeficiente de Dice } (S_D) = 2a / (2a + b + c)$$

$$\text{Coeficiente de Jaccard } (S_J) = a / (a + b + c)$$

$$\text{Coeficiente de Concordancia Simple } (S_{SM}) = (a + d) / (a + b + c + d)$$

Como ya se ha señalado, las técnicas de digestión del mtDNA, cariotipo electroforético y RAPD son usualmente utilizadas en la identificación y diferenciación de cepas vínicas de *S. cerevisiae* y todas se basan en la posición de bandas electroforéticas. El método de RAPD es utilizado frecuentemente para estudios sobre identificación y análisis filogenético de hongos infecciosos, pero por su elevado costo no es adecuado para analizar un gran número de muestras. Por su parte, la digestión del mtDNA es útil para una rápida diferenciación de un gran número de cepas de *S. cerevisiae*, pero podría ser poco confiable para análisis filogenéticos debido a la inestabilidad que exhibe este DNA frente al efecto mutagénico del etanol (Benítez y cols., 1996; Ibeas y Jiménez, 1997).

En este trabajo se sugiere la evaluación de la técnica de electroforesis de campo pulsado para determinar el carácter autóctono de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* aisladas en Chile. Esta técnica es ampliamente aceptada para la identificación de

especies y también es una poderosa herramienta para visualizar el elevado polimorfismo cariotípico entre las poblaciones naturales de *S. cerevisiae*. Es capaz de exhibir los rearrreglos cromosómicos sufridos por una levadura, cuya acumulación puede estar implicada en el proceso de especiación (Fischer y cols., 2000). Esto último implica que mientras una cepa experimente más rearrreglos cromosómicos o estos sean de mayor tamaño, más lejana estará de su original, pudiéndose suponer que cepas con cariotipos electroforéticos muy similares tienen un grado de parentesco más cercano que con las que presentan cariotipos más disímiles.

## **2. HIPÓTESIS**

## 2.1. Hipótesis de investigación (H<sub>i</sub>)

Si la divergencia evolutiva entre cepas de *S. cerevisiae* se correlaciona con su distancia geográfica, entonces mediante análisis de similitud genética por marcadores moleculares será posible deducir el origen geográfico de aislados nativos.

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo general**

Estudiar la capacidad del cariotipo electroforético para la definición del carácter autóctono de aislados silvestres de levadura *S. cerevisiae*.

### **3.2. Objetivos específicos**

1. Crear una base de datos de marcadores moleculares para aislados de *S. cerevisiae* obtenidos de diferentes localidades geográficas.
2. Calcular distancia genética entre cepas a partir de la información molecular.
3. Evaluar la utilidad del polimorfismo cromosómico como indicador de distancia genética.
4. Determinar la presencia de cepas vínicas autóctonas de *S. cerevisiae* en Chile.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 4.1. Cepas

Se utilizaron 304 cepas de levaduras vínicas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* provenientes de diferentes áreas vitivinícolas. Las muestras de levaduras aisladas en Chile provienen de los valles del Maipo, Curicó y Maule, los cuales pertenecen a la región vitivinícola del valle central<sup>1</sup>. Los aislados colectados en otras regiones provienen del valle de Ica de Perú, de la región de Canelones de Uruguay y de las provincias de Alicante, Barcelona, Cádiz, Córdoba, Valencia y Valladolid de España. La toma de muestras de estas cepas se indica en la sección 4.3. Se incluyeron además 19 cepas de levaduras de frecuente uso comercial en la industria vitivinícola (dos de las cuales, cepa 32 y cepa 36, corresponden a la misma cepa comercializada por distintas empresas y se utilizaron como control) y una cepa aislada recientemente en Chile que está siendo comercializada que se incluyó por duplicado a modo de control: cepa 35 y cepa 42. Aparte, también se incluyó la cepa tipo de *S. cerevisiae* YNN295 que fue otorgada por la Dra. Tahía Benítez Fernández de la Universidad de Sevilla, España y la cepa UCD 67-385 de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, la cual fue utilizada como

---

<sup>1</sup> En Chile la legislación relacionada con la producción de vinos incluye a la ley 18.455 de 1985, que fija reglas para la producción, elaboración y comercialización de bebidas alcohólicas y al decreto 464 dictado por el Ministerio de Agricultura en Diciembre de 1994, que establece las zonas vitivinícolas, normas sobre denominación de origen, indicación de cepajes y año de cosecha, junto con otros aspectos relevantes para la comercialización y rotulación de los vinos.

*“outgroup”* en los análisis por RAPD. Todas las cepas usadas se encuentran indicadas en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas de levaduras utilizadas en este estudio.

ORIGEN	Nº CEPAS	DENOMINACIÓN <sup>a</sup>
<b>CHILE</b>	<b>223</b>	
VALLE DEL MAULE	165	Cla 001, Cla 002, Cla 003, Cla 004, Cla 005, Cla 006, Cla 007, Cla 008, Cla 009, Cla 010, Cla 011, Cla 012, Cla 013, Cla 014, Cla 015, Cla 016, Cla 017, Cla 018, Cla 019, Cla 020, Cla 021, Cla 022, Cla 023, Cla 024, Cla 025 (11947), Cla 026, Cla 027, Cla 028, Cla 029, Cla 030, Cla 031, Cla 032, Cla 033, Cla 034, Cla 035, Cla 036, Cla 037, Cla 038, Cla 039, Cla 040, Cla 041, Cla 042, Cla 043, Cla 044, Cla 045, Cla 046, Cla 047, Cla 048, Cla 049, Cla 050, Cla 051, Cla 052, Cla 053, Cla 054, Cla 055, Cla 056, Cla 057, Cla 058, Cla 059, Cla 060, Cla 061, Cla 062, Cla 063, Cla 064, Cla 065, Cla 066, Cla 067, Cla 068, Cla 069, Cla 070, Cla 071, Cla 072, Cla 073, Cla 074, Cla 075, Cla 076, Cla 077, Cla 078, Cla 079, Cla 080, Cla 081, Cla 082, Cla 083, Cla 084, Cla 085, Cla 086, Cla 087, Cla 088, Cla 089, Cla 090, Cla 091, Cla 092, Cla 093, Cla 094, Cla 095, Cla 096, Cla 097, Cla 098 (11949), Cla 099, Cla 100, Cla 101 (11948), Cla 102, Cla 103, Cla 104, Cla 105, Cla 106, Cla 107, Cla 108, Cla 109, Cla 110, Cla 111, Cla 112, Cla 113, Cla 114, Cla 115, Cla 116, Cla 117, Cla 118, Cla 119, Cla 120, Cla 121, Cla 122, Cla 123, Cla 124, Cla 125, Cla 126, Cla 127, Cla 128, Cla 129, Cla 130, Cla 131, Cla 132 (11942), Cla 133, Cla 134, Cla 135, Cla 136, Cla 137, Cla 138, Cla 139, Cla 140, Cla 141, Cla 142, Cla 143, Cla 144, Cla 145, Cla 146, Cla 147, Cla 148, Cla 149, Cla 150, Cla 151, Cla 152, Cla 153, Cla 154, Cla 155, Cla 156, Cla 157, Cla 158, Cla 159, Cla 160, Cla 161, Cla 162, Cla 163, Cla 164, Cla 165
VALLE DE CURICÓ	44	Clb 01, Clb 02, Clb 03, Clb 04, Clb 05, Clb 06, Clb 07, Clb 08, Clb 09, Clb 10, Clb 11, Clb 12, Clb 13, Clb 14, Clb 15, Clb 16, Clb 17, Clb 18, Clb 19, Clb 20, Clb 21, Clb 22, Clb 23, Clb 24, Clb 25, Clb 26, Clb 27, Clb 28, Clb 29, Clb 30, Clb 31, Clb 32, Clb 33, Clb 34, Clb 35, Clb 36, Clb 37, Clb 38, Clb 39, Clb 40, Clb 41, Clb 42, Clb 43, Clb 44
VALLE DEL MAIPO	14	Clc 01, Clc 02, Clc 03, Clc 04, Clc 05, Clc 06, Clc 07, Clc 08, Clc 09, Clc 10, Clc 11, Clc 12, Clc 13, Clc 14

<b>PERÚ<sup>b</sup></b>	<b>21</b>	
VALLE DE ICA	21	Pe 01, Pe 02, Pe 03, Pe 04, Pe 05, Pe 06, Pe 07 Pe 08, Pe 09, Pe 10, Pe 11, Pe 12, Pe 13, Pe 15 Pe 16, Pe 17, Pe 18, Pe 19, Pe 20, Pe 21
<b>URUGUAY<sup>c</sup></b>	<b>19</b>	
CANELONES	19	Uy 01, Uy 02, Uy 03, Uy 04, Uy 05, Uy 06, Uy 07 Uy 08, Uy 09, Uy 10, Uy 11, Uy 12, Uy 13, Uy 14 Uy 15, Uy 16, Uy 17, Uy 18, Uy 19
<b>ESPAÑA<sup>d</sup></b>	<b>21</b>	
ALICANTE	6	CECT: 1891, 1892, 1893, 1894, 1895, 1896
CÁDIZ	2	CECT: 1329, 1883
BARCELONA	6	CECT: 11602, 11616, 11618, 11621, 11642, 11650
CÓRDOBA	2	CECT: 1481, 1482
VALENCIA	3	CECT: 1483, 1484, 1682
VALLADOLID	2	CECT: 1683, 1885
<b>COMERCIALES</b>	<b>20</b>	
AUSTRALIA <sup>e</sup>	1	Cepa 28 (Arom D, EA Food Ingredients)
CHILE	1	Cepa 35 y Cepa 42 (LV-CB, DSM Food Specialties)
FRANCIA	18	Cepa 29 (P1, LAP) Cepa 30 (C12, LAP) Cepa 31 (AWRI R2, EA Food Ingredients) Cepa 32 (UCD-522, LAP) Cepa 33 (Cryoaromae, DSM Food Specialties) Cepa 34 (N°4882, DSM Food Specialties) Cepa 36 (UCD 522, DSM Food Specialties) Cepa 37 (EG-8, DSM Food Specialties) Cepa 38 (Epernay-2, DSM Food Specialties) Cepa 39 (N°7013, DSM Food Specialties) Cepa 40 (N°8906, DSM Food Specialties) Cepa 41 (N°8130, DSM Food Specialties) Cepa 43 (N°LW07, DSM Food Specialties) Cepa 44 (N°LW05, DSM Food Specialties)

			Cepa 45 (VL3, Laffort Oenologie) Cepa 46 (EC-1118, Lallemand) Cepa 47 (N°2881, DSM Food Specialties) Cepa 48 (UP30Y5, DSM Food Specialties)
<b>CEPA TIPO DE S.</b>	<b>1</b>		
<b><i>cerevisiae</i><sup>f</sup></b>		YNN 295	
<b>CEPA X.</b>	<b>1</b>		
<b><i>dendrorhous</i></b>		UCD 67-385	
<b>TOTAL CEPAS</b>	<b>306</b>		

- <sup>a</sup> Nomenclatura asignada por el laboratorio de microbiología aplicada (LAMAP). Entre paréntesis se indica la nueva nomenclatura de aquellas cepas que han sido depositadas en ceparios internacionales o la nomenclatura comercial en el caso de las cepas de uso industrial. En el caso de las cepas españolas se utiliza la nomenclatura de la Colección Española de Cultivos Tipos (CECT).
- <sup>b</sup> Cepas otorgadas por el Dr. Juan Carlos Tantaleán Vásquez y la Sra. Rosa Altamirano Díaz, Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Ica, Perú.
- <sup>c</sup> Cepas otorgadas por DSM Food Specialties, Santiago, Chile.
- <sup>d</sup> Cepas otorgadas por la Dra. Amparo Querol Simón, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia, España.
- <sup>e</sup> Esta cepa fue obtenida desde una colección australiana, pero no se tiene certeza de si fue aislada en Australia (Isak Sakkie Pretorius, comunicación personal).
- <sup>f</sup> Cepa otorgada por la Dra. Tahía Benítez Fernández, Universidad de Sevilla, España.

## 4.2. Soluciones y medios de cultivo

Las cepas de *S. cerevisiae* fueron cultivadas en medio YPD a 27 °C y los cultivos de *X. dendrorhous* fueron desarrollados en medio YM a 22 °C. Estas levaduras fueron mantenidas por mayor tiempo en una solución 1:1 de YPD y glicerina a -86 °C. La composición de los medios de cultivo, así como de las soluciones utilizadas se encuentra en el anexo 1.

## 4.3. Toma de muestras

Las levaduras recolectadas en Chile se obtuvieron desde microvinificaciones realizadas en las zonas de producción o en laboratorio, a partir de mosto natural sin sulfitar correspondiente a la vendimia del año 1999. La toma de muestras y selección de levaduras provenientes de los valles del Maule y de Curicó fue realizada por el grupo de trabajo del Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Santiago de Chile, mientras que el procedimiento con muestras del valle del Maipo fue realizado por el grupo de trabajo del Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Las muestras de levaduras fueron obtenidas en la fase final de las microvinificaciones, las cuales fueron realizadas en bidones de plástico de 10 L a temperaturas entre 20 y 25 °C. Se consideró como fase final de las fermentaciones cuando la medición de la densidad del vino por métodos aerométricos se hizo constante (Bordeu y Scarpa, 1998).

Las muestras de vino obtenidas se diluyeron en agua entre  $10^4$  a  $10^6$  veces e inmediatamente se sembraron en placas con medio YPD y se incubaron a 27 °C hasta obtener colonias. Estas colonias fueron posteriormente separadas en placas de medio YPD por réplica individual mediante el uso de mondadientes.

Con el objeto de identificar aquellos aislados que corresponden al género *Saccharomyces*, inicialmente, se sembraron colonias individuales en medio sólido lisina (Oxoid) según instrucciones del proveedor. Este medio de cultivo no permite el crecimiento de levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*, debido a que ellas no son capaces de utilizar este aminoácido como única fuente de nitrógeno (Oxoid).

En los aislados del valle del Maipo se realizó, posteriormente, una selección de acuerdo a las diferencias morfológicas observadas. Es decir, de las colonias que no

crecieron en el medio lisina se seleccionaron aquellas que presentaban diferencias morfológicas.

En el caso de los aislados de los valles del Maule y Curicó, alrededor del 50 % de aquellas colonias que no crecieron en el medio lisina fueron sometidas a la técnica de PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS del rDNA según el método de Esteve-Zarzoso y cols. (1999). Para esto, se utilizaron los partidores ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (Invitrogen) y las condiciones de PCR fueron las siguientes: denaturación inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de denaturación a 94 °C por 1 min, alineación a 55,5 °C por 2 min y elongación a 72 °C por 2 min; y una elongación final a 72 °C por 10 min. Los productos de esta amplificación con tamaños de alrededor de 880 pb, característicos de las levaduras del grupo *Saccharomyces sensu stricto*, fueron sometidos a digestión con la enzima *HaeIII* (Boehringer Mannheim), que para *S. cerevisiae* genera cuatro fragmentos de 320, 230, 180 y 150 pb. Los productos de PCR y los fragmentos de RFLP-PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1,4 y 3,0 %, respectivamente, en TBE 0,5x usando como patrón de tamaño molecular el marcador de 100 pb (Gibco-BRL). Debido a que el número de aislados fue elevado, se procedió a identificar aquellos que fueron idénticos entre sí por medio de análisis de los perfiles de digestión del mtDNA, como se indica en la sección 4.5.

Las colonias del valle del Maipo también fueron analizadas por PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS y por digestión del mtDNA, para asegurar que pertenecen a la especie *S. cerevisiae* y que cada colonia correspondía a una cepa diferente.

Las cepas de levaduras vínicas procedentes del Valle de Ica, Perú, que provienen de fermentaciones espontáneas de mosto natural, fueron facilitadas por el Dr. Juan Carlos Tantaleán Vásquez y la Sra. Rosa Altamirano Díaz de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Ica, Perú. Las levaduras de la región de Canelones, Uruguay, corresponden a aislados silvestres obtenidos de fermentaciones de mosto natural y fueron proporcionados por DSM Food Specialties, Santiago, Chile. Finalmente, las cepas de origen español fueron otorgadas por la Dra. Amparo Querol Simón del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Valencia, España y corresponden a cepas *S. cerevisiae* de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

#### **4.4. Extracción DNA total**

La extracción del DNA genómico de levaduras se realizó con el sistema *Wizard*®, *Genomic DNA Purification kit* (Promega), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para esto la levadura fue crecida en 5 mL de caldo YPD por 15 a 18 h a 27

°C con 140 rpm de agitación (Multitron, Infors AG). Las células de 2 mL de este cultivo se colectaron en un microtubo (Eppendorf) por centrifugación a 13000 rpm por 2 min (microcentrifuga 5415D, Eppendorf) y se resuspendieron en 300 µL de EDTA 50 mM. Posteriormente, la suspensión se trató con 10 µL de zimoliasa 20T (Seikagaku Corporation) a 20 mg/mL por 45 min a 37 °C con agitación a 400 rpm (Termomixer Comfort y Compact, Eppendorf), para luego colectar los esferoplastos mediante centrifugación a 13000 rpm por 2 min. Los esferoplastos fueron resuspendidos en 300 µL de la solución *nuclei lysis solution* y luego se agregaron 100 µL de la solución *protein precipitation solution* y la mezcla se agitó en vórtex vigorosamente por 20 s e inmediatamente las muestras se colocaron en hielo. Una vez transcurridos 5 min se centrifugaron a 13000 rpm por 15 min a 4 °C (Universal 32R, Hettich) y el sobrenadante que contiene el DNA fue traspasado a un microtubo limpio al cual se le había agregado previamente 300 µL de isopropanol a temperatura ambiente. El tubo fue suavemente invertido varias veces hasta que el DNA precipitó. Los tubos fueron centrifugados a 13000 rpm por 2 min para colectar el DNA, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado dos veces con 300 µL de etanol al 70 % a temperatura ambiente. Luego de secar el precipitado, éste se rehidrató con 50 µL de TE pH 7,4. Finalmente, las muestras se almacenaron a 4 °C y el DNA fue cuantificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en TBE 0,5x a 100 volt utilizando como marcador el DNA del fago

lambda digerido con *Hind*III (Winkler & Zawadzky Ltda.). Este método permitió obtener aproximadamente 100 ng de DNA por cada 2 mL de cultivo.

#### 4.5. Digestión del DNA mitocondrial

La digestión del mtDNA con enzimas de restricción se realizó utilizando el método desarrollado por Querol y cols. (1992a). Para ello, 1 µg del DNA total obtenido en la sección 4.4 fue digerido con una unidad de la enzima de restricción *Hinf*I (10 U/µL) en tampón H 10x (Boehringer Mannheim) por 3 h a 37 °C. Las bandas generadas de la restricción del mtDNA fueron separadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % en TBE 0,5x a 70 volt y visualizadas por tinción con bromuro de etidio con un transiluminador UV (TCP-20.M, Vilber Lourmat). Todos los geles de las digestiones fueron fotografiados con una cámara digital (DC120, Kodak) para mantener un registro. En consideración que la distancia migrada por los fragmentos de restricción es inversamente proporcional al logaritmo de su longitud en pares de bases, los tamaños de los fragmentos obtenidos se determinaron comparándolos con fragmentos cuyos tamaños son conocidos. Para esto, el DNA del fago lambda digerido con *Eco*RI y *Hind*III (Winkler & Zawadzky Ltda.) se utilizó como marcador de tamaño molecular y

mediante el programa computacional Quantity One (Bio-Rad) se obtuvieron los tamaños de los fragmentos de los perfiles de restricción para cada cepa.

#### 4.6. Cariotipo electroforético

Para la obtención de los patrones de cariotipo electroforético se realizaron preparaciones de cromosomas intactos de levadura según el método modificado de Swartz y Cantor (1984).

Para esto, cultivos de 50 mL en YPD fueron crecidos a 27 °C toda la noche. Las células se colectaron por centrifugación a 3200 rpm por 5 min a 15 °C (Centra MP4R, Thermo IEC) y se lavaron dos veces con EDTA 50 mM pH 8,0. Luego, las células se resuspendieron en un volumen de no más de 1 mL de EDTA 50 mM pH 8,0 y se incubaron con 2,5 mg de zimoliasa 20T (Seikagaku Corp.) por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se mezclaron con 3 mL de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % en EDTA 125 mM previamente fundida y mantenida a 42 °C y rápidamente la mezcla se vertió en moldes para generar así bloques de agarosa que contendrán los cromosomas intactos de levadura. Estos bloques se mantuvieron sumergidos en solución LET con 2 mg de zimoliasa 20T por 16 h a 37 °C. Luego, se

lavaron los bloques dos veces con EDTA 50 mM y se incubaron durante 24 h a 50 °C en solución NDS conteniendo 0,5 mg/mL de proteinasa K (Gibco-BRL). Finalmente, se realizaron seis lavados con TE a intervalos de 30 minutos, tres a 50 °C y tres a temperatura ambiente. Los bloques fueron conservados en EDTA 50 mM pH 8,0 a 4 °C. La separación de las bandas cromosómicas se realizó mediante electroforesis de campo pulsado en un gel de agarosa al 1 % en TBE 0,5x utilizando un aparato CHEF DRII (Bio-Rad), con el siguiente programa: el primer bloque con un pulso de 60 s por 12 h y el segundo de 120 s por 12 h, ambos a 6 V/cm, 14 °C, y un ángulo de 120°. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, visualizados con un transiluminador UV y registrados fotográficamente. Se utilizó la cepa tipo YNN 295 como marcador de tamaño molecular cromosómico. Utilizando el programa Quantity One se obtuvieron los tamaños de las bandas cromosomales de cada cepa analizada, teniendo en cuenta que los fragmentos de DNA sobre cientos de kilobases muestran una movilidad electroforética a través de la matriz de agarosa inversamente proporcional a su tamaño.

#### **4.7. RAPD**

Con el objeto de evaluar la relación filogenética entre algunos de los aislados utilizados en este estudio se realizaron análisis de RAPD. Las mezclas de PCR se

prepararon para un volumen final de 50  $\mu$ L y consistieron en 10 pmol de partidador (Operon Technologies), 2 mM  $MgCl_2$  (Gibco-BRL), 2 unidades de enzima *Taq* polimerasa (Gibco-BRL), tampón para la reacción de PCR al 1x (Gibco-BRL), 100  $\mu$ M dNTP's (Gibco-BRL), 30 pg de DNA y la cantidad necesaria de agua destilada estéril. Las condiciones para la reacción fueron las siguientes: denaturación inicial a 95 °C por 3 min; 40 ciclos de denaturación a 94 °C por 1 min, alineación a 35 °C por 2 min y elongación a 72 °C por 2 min; y una elongación final a 72 °C por 5 min. Los fragmentos amplificados fueron migrados en geles de agarosa al 1,4 % en TBE 0,5x a 70 volt. Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante tinción con bromuro de etidio y fotografiados para mantener un registro de ellos. En cada partida de reacciones se utilizó un blanco sin DNA y un blanco sin partidador con el fin de tener controles de las amplificaciones por PCR. Utilizando el programa Quantity One y la escala de 100 pb de DNA (Gibco-BRL) como marcador de tamaño molecular, se obtuvieron los tamaños de las bandas polimórficas generadas por cada cepa para cada partidador.

#### 4.8. Análisis de datos

Los datos obtenidos por los tres métodos ensayados en este estudio fueron analizados de manera similar, ya que todos están basados en la posición de bandas

electroforéticas. De esta forma, para cada método se determinó el número total de bandas producidas por los aislados utilizados y se generó un patrón de tamaño molecular que contiene esta suma de bandas. Luego, mediante la comparación del perfil electroforético de cada aislado con el patrón de la suma de bandas se obtuvo una matriz de datos binarios. A partir de la matriz binaria y utilizando el programa computacional StatBoxPro versión 5.0 (Grimmer, 2001), se calcularon los coeficientes matemáticos de similitud de Dice, Jaccard y de concordancia simple, sin embargo, con el fin de tener valores de distancia se calculó, con el mismo programa computacional, la disimilitud (1 - similitud) entre las muestras (Hillis y Moritz, 1990).

Utilizando el programa MEGA versión 2.1 (Kumar y cols., 2001) se pudo obtener un dendrograma, como representación gráfica de la disimilitud entre las muestras, a partir de los datos de distancia mediante el método UPGMA (del inglés *unweighted pair-group method using arithmetic averages*, método de agrupamiento de los promedios no ponderados). Este método de agrupamiento de muestras es el más simple para la construcción de árboles y uno de los más comunes para datos de distancia, al asumir que la tasa de evolución permanece constante a través de la historia evolutiva de las taxa incluidas.

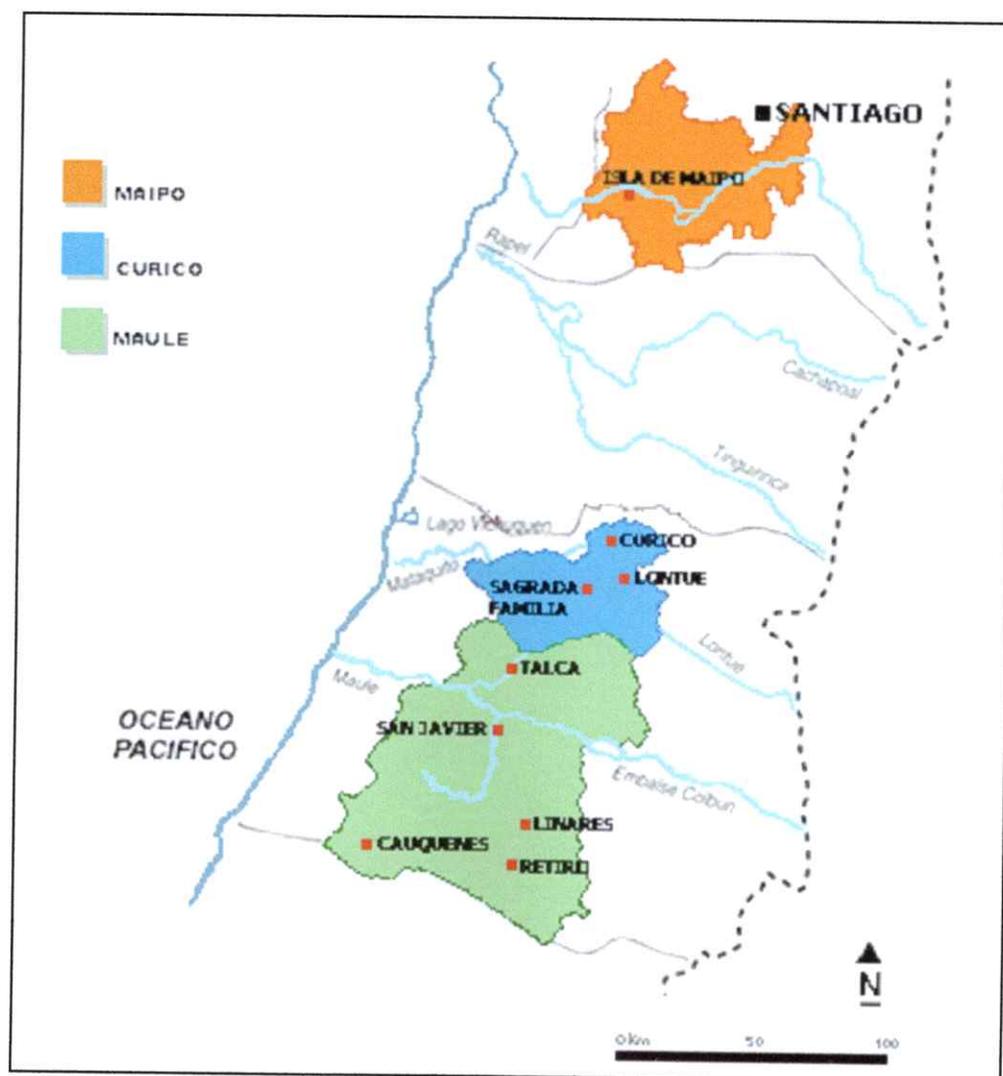
## **5. RESULTADOS**

### 5.1. Levaduras vínicas recolectadas en Chile

Las colonias recolectadas en Chile provienen de distintas áreas vitivinícolas dentro de los valles del Maipo, Curicó y Maule (figura 1). En la mayoría de los viñedos allí muestreados existe una importante “industrialización” de las técnicas de vinificación, por ejemplo, con un amplio uso de cepas de levaduras comerciales. Sólo algunas áreas en el valle del Maule mantienen una actividad más artesanal para la elaboración de sus vinos, por lo que en estas zonas más tradicionales la posibilidad de encontrar cepas autóctonas de *S. cerevisiae* debería ser mayor, aunque no es posible descartar que producto de prácticas enológicas de abono de campo con los desechos orgánicos de las fermentaciones exista, por distintos factores como el viento, los insectos y otros, una dispersión de cepas comerciales entre zonas cercanas.

La tabla 2 resume la preselección total realizada a las colonias recolectadas en Chile. En la preselección de las colonias realizada mediante el análisis con el medio lisina, se obtuvo que el 100 % de estas colonias corresponden al género *Saccharomyces*. Asimismo, con el análisis de PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS del rDNA se obtuvo que el 100 % de las colonias analizadas pertenecen a la especie *S. cerevisiae*.

**Figura 1. Mapa de la región vitivinícola del valle central de Chile.** Los valles del Maipo, Curicó y Maule son resaltados con colores y las principales zonas de recolección de levaduras están marcadas con un punto rojo.



• Fuente: Chilevinos

**Tabla 2: Preselección de los aislados de levaduras *S. cerevisiae* recolectados en Chile en los valles del Maipo, Curicó y Maule.**

SUBREGIÓN VITIVINÍCOLA MUESTREADA	Nº COLONIAS RECOLECTADAS Y ANALIZADAS POR MEDIO LISINA	Nº COLONIAS ANALIZADAS POR PCR-RFLP Y MTDNA	Nº CEPAS <i>S. cerevisiae</i> DIFERENTES POR ANÁLISIS DE MTDNA	Nº CEPAS <i>S. cerevisiae</i> UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO
VALLE DEL MAIPO <sup>a</sup>	36	14	14	14
VALLE DE CURICÓ	693	348	97	44
VALLE DEL MAULE	1109	577	188	165
<b>TOTAL</b>	<b>1838</b>	<b>939</b>	<b>299</b>	<b>223</b>

a Las colonias aisladas en el valle del Maipo fueron seleccionadas según sus diferencias morfológicas luego del análisis con el medio lisina, obteniéndose 14 colonias morfológicamente diferentes.

En el caso de las colonias aisladas en el valle del Maipo, el análisis por PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS del rDNA se realizó a colonias previamente seleccionadas por sus diferencias morfológicas, correspondientes al 38,8 % de las colonias analizadas por el medio restrictivo de lisina.

Como muestra la tabla 2, mediante la preselección realizada con el análisis de digestión del mtDNA se pudo disminuir el número de aislados recolectados en los valles de Curicó y del Maule en alrededor de un 70 % (de 925 colonias 285 fueron cepas diferentes), pero el número total de muestras continuó siendo muy elevado para este estudio. Por ello, se disminuyó el número de aislados de *S. cerevisiae* desde 285 a 209, eligiéndolas aleatoriamente. En el caso de las muestras del valle del Maipo se mantuvieron las 14 cepas preseleccionadas por ser diferentes tanto por la morfología de las colonias como por sus perfiles de restricción del mtDNA.

A partir de los datos obtenidos en la preselección realizada para disminuir el número de colonias aisladas, se puede obtener información acerca de la diversidad de cepas según la subregión vitivinícola muestreada. En el valle del Maipo los aislados analizados por este método fueron previamente seleccionados por sus diferencias morfológicas, por lo que no se utilizó este dato para establecer una comparación sobre la diversidad de cepas. En el valle de Curicó se obtuvieron 97 cepas diferentes en sus perfiles de restricción de mtDNA de un total de 348 colonias seleccionadas como

pertenecientes a *S. cerevisiae* ( $27,9 \pm 17,8$  % de cepas diferentes), mientras en el caso del valle del Maule se obtuvieron 188 cepas distintas de un total de 577 colonias ( $32,6 \pm 18,3$  % de cepas diferentes) (tabla 3).

Sin embargo, como en el valle del Maule sólo algunas áreas de muestreo mantienen técnicas tradicionales de vinificación, sólo se consideraron los aislados que provienen desde estas áreas (8 áreas de las 11 muestreadas). En el valle de Curicó se consideraron sólo las áreas cercanas a centros de producción vitivinícolas industrializados (5 áreas de las 9 muestreadas). Como se observa en la tabla 4 los resultados muestran claras diferencias, ya que desde las áreas industrializadas del valle de Curicó se obtuvieron 56 cepas distintas por sus perfiles de restricción de mtDNA de un total de 210 colonias *S. cerevisiae* ( $26,7 \pm 5,7$  % de cepas diferentes) y desde las zonas tradicionales del valle del Maule se obtuvieron 158 cepas distintas por sus perfiles de restricción de mtDNA de un total de 419 colonias de *S. cerevisiae* ( $37,7 \pm 13,0$  % de cepas diferentes). Estos resultados sugieren que en las zonas vitivinícolas con una actividad menos industrializada existe una mayor diversidad de levaduras de la especie *S. cerevisiae*.

**Tabla 3: Diversidad de cepas *S. cerevisiae* según sus perfiles de restricción del mtDNA en los valles de Curicó y Maule.**

	Nº COLONIAS <i>S. cerevisiae</i> POR LISINA Y PCR-RFLP	Nº CEPAS <i>S. cerevisiae</i> DIFERENTES POR ANÁLISIS DE MTDNA	% CEPAS DIFERENTES POR SUS PERFILES DE RESTRICCIÓN DEL MTDNA
VALLE DE CURICÓ	348	97	27,9 ± 17,8
VALLE DEL MAULE	577	188	32,6 ± 18,3

**Tabla 4: Diversidad de cepas *S. cerevisiae* según sus perfiles de restricción de mtDNA en áreas de recolección industrializadas del valle de Curicó y no industrializadas del valle del Maule.**

	Nº COLONIAS <i>S. cerevisiae</i> POR LISINA Y PCR-RFLP	Nº CEPAS <i>S. cerevisiae</i> DIFERENTES POR ANÁLISIS DE MTDNA	% CEPAS DIFERENTES POR SUS PERFILES DE RESTRICCIÓN DEL MTDNA
ÁREAS CON TÉCNICAS DE VINIFICACIÓN INDUSTRIALIZADA	210	56	26,7 ± 5,7
ÁREAS CON TÉCNICAS DE VINIFICACIÓN TRADICIONALES	419	157	37,7 ± 13,0

## 5.2. Digestión del DNA mitocondrial

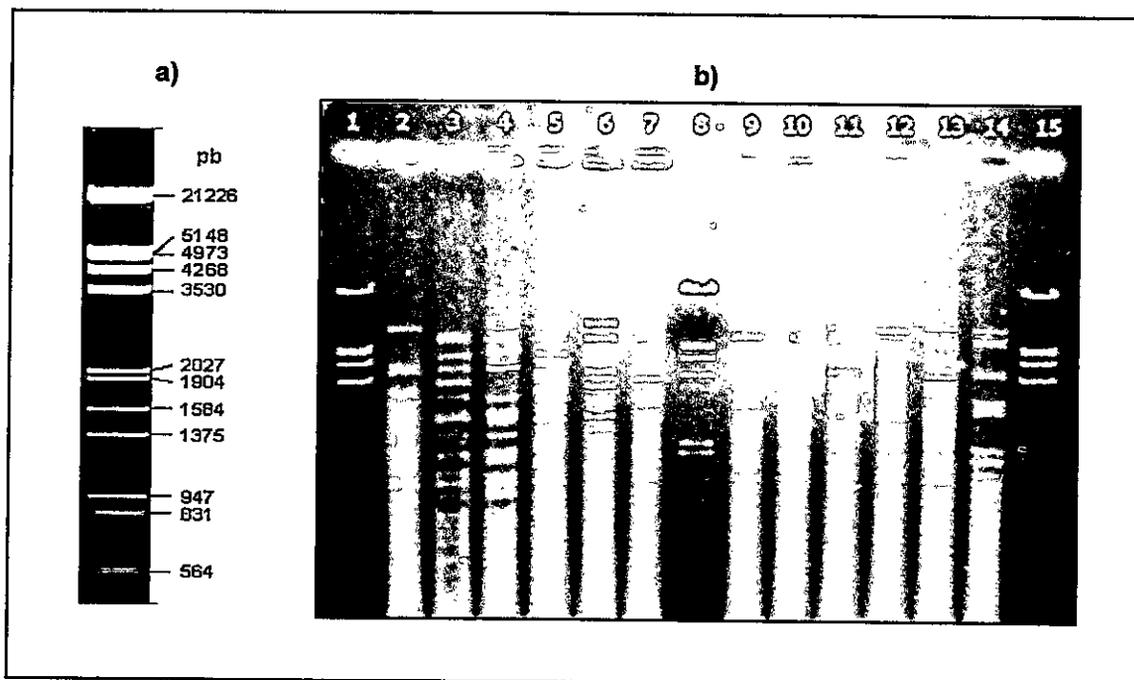
Debido a que la técnica de digestión del mtDNA permitió una diferenciación rápida y confiable para un elevado número de muestras en la preselección de las levaduras, nuevamente fue utilizada con la finalidad de limitar el número de aislados recolectados en Chile que serían utilizados posteriormente en el análisis de cariotipo electroforético. Además, esta metodología nos permitió realizar una aproximación preliminar sobre el grado de similitud entre las cepas de acuerdo a sus perfiles de restricción, por lo cual se incluyeron también algunas cepas de otras procedencias. Se realizó así la digestión del mtDNA a un total de 299 cepas procedentes de diferentes regiones vitivinícolas (tabla 5).

Los tamaños de los fragmentos de restricción fueron obtenidos utilizando el DNA del fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII*, como patrón. En la figura 2a se muestra el patrón de tamaño molecular utilizado con los tamaños de cada banda en pares de bases, mientras que en la figura 2b se muestra un ejemplo de los perfiles de digestión del mtDNA obtenidos para 12 cepas de *S. cerevisiae*.

**Tabla 5: Cantidad de levaduras vínicas *S. cerevisiae* analizadas por digestión del mtDNA.**

Origen	Digestión mtDNA
Valle del Maule	165
Valle de Curicó	44
Valle del Maipo	14
Perú	21
Uruguay	19
España	17
Comerciales	19
<b>Total</b>	<b>299</b>

**Figura 2. Digestión del mtDNA de aislados *S. cerevisiae*.** a) Marcador de tamaño molecular DNA del fago lambda digerido con *EcoRI* + *HindIII*. A la derecha se especifica el tamaño de las bandas en pares de bases. b) Ejemplo de un gel con doce muestras (carriles 2 al 7 y 9 al 14) de digestión del mtDNA de levaduras con *HinfI*. Los carriles 1, 8 y 15 corresponden al marcador  $\lambda$ *HindIII*+*EcoRI*.



### 5.3. Análisis de los datos de RFLP del DNA mitocondrial

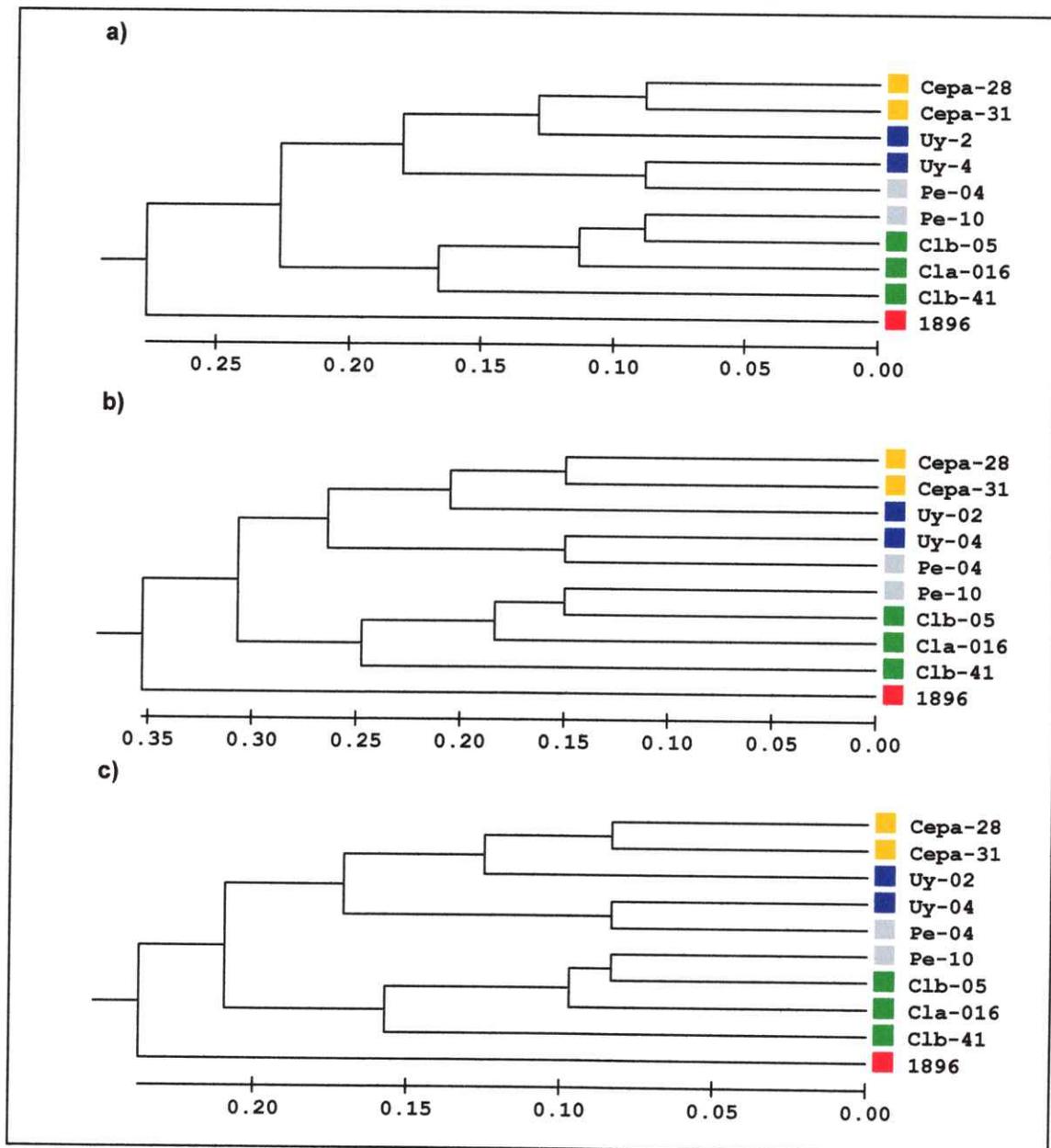
Para poder comparar los 299 perfiles de restricción obtenidos se generó un patrón con rangos de tamaños en pares de bases a partir de la suma de fragmentos de restricción generados por el total de las muestras. Así, cada perfil de restricción se fue comparando con este patrón general que posee 26 bandas entre 1,5 y 20 kb.

En la creación de este patrón se tomó la precaución que no se incluyera más de un fragmento de una misma cepa en el mismo rango de bandas y se comprobó que los controles de las cepas comerciales iguales (cepa 35 con cepa 42 y cepa 32 con cepa 36) dieran un perfil idéntico en la matriz de presencia y ausencia. De esta forma, se creó una matriz binaria donde la presencia de la banda es señalada como 1 y la ausencia como 0 .

Los coeficientes matemáticos de Dice, Jaccard y concordancia simple se aplicaron a los datos de la matriz binaria de los perfiles de restricción del mtDNA de 10 cepas distintas, con el objeto de definir el más adecuado para analizar nuestros datos (figura 3). La escala utilizada indica el grado de disimilitud entre las cepas, es decir, el porcentaje de disimilitud representado como fracción. Las diferencias encontradas entre los dendrogramas generados fueron sólo de la distancia, pues las relaciones de similitud se mantienen. Por lo tanto, para calcular la distancia entre las muestras se decidió utilizar

**Figura 3. Dendrogramas con UPGMA elaborados con los datos de distancia genética del análisis de los perfiles de restricción del mtDNA con *Hinf*I de 10 cepas de *S. cerevisiae* obtenidos con distintos coeficientes matemáticos. a) Coeficiente de Dice. b) Coeficiente de Jaccard. c) Coeficiente de concordancia simple. La escala en eje de la abcisa indica el grado de disimilitud entre las cepas. Los diferentes colores se relacionan con el lugar de origen de recolección de las distintas cepas:**

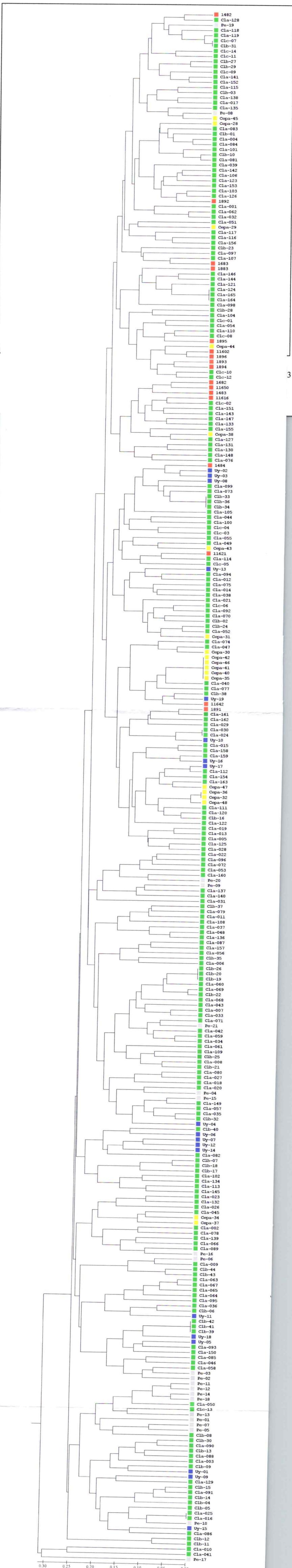
■ = Chile    ■ = Perú    ■ = Uruguay    ■ = España    ■ = Comerciales



el coeficiente de Dice, que otorga mayor valor a las bandas compartidas entre dos muestras y excluye las bandas ausentes compartidas, debido a que este es uno de los coeficientes de similitud más ampliamente utilizado en este tipo de análisis.

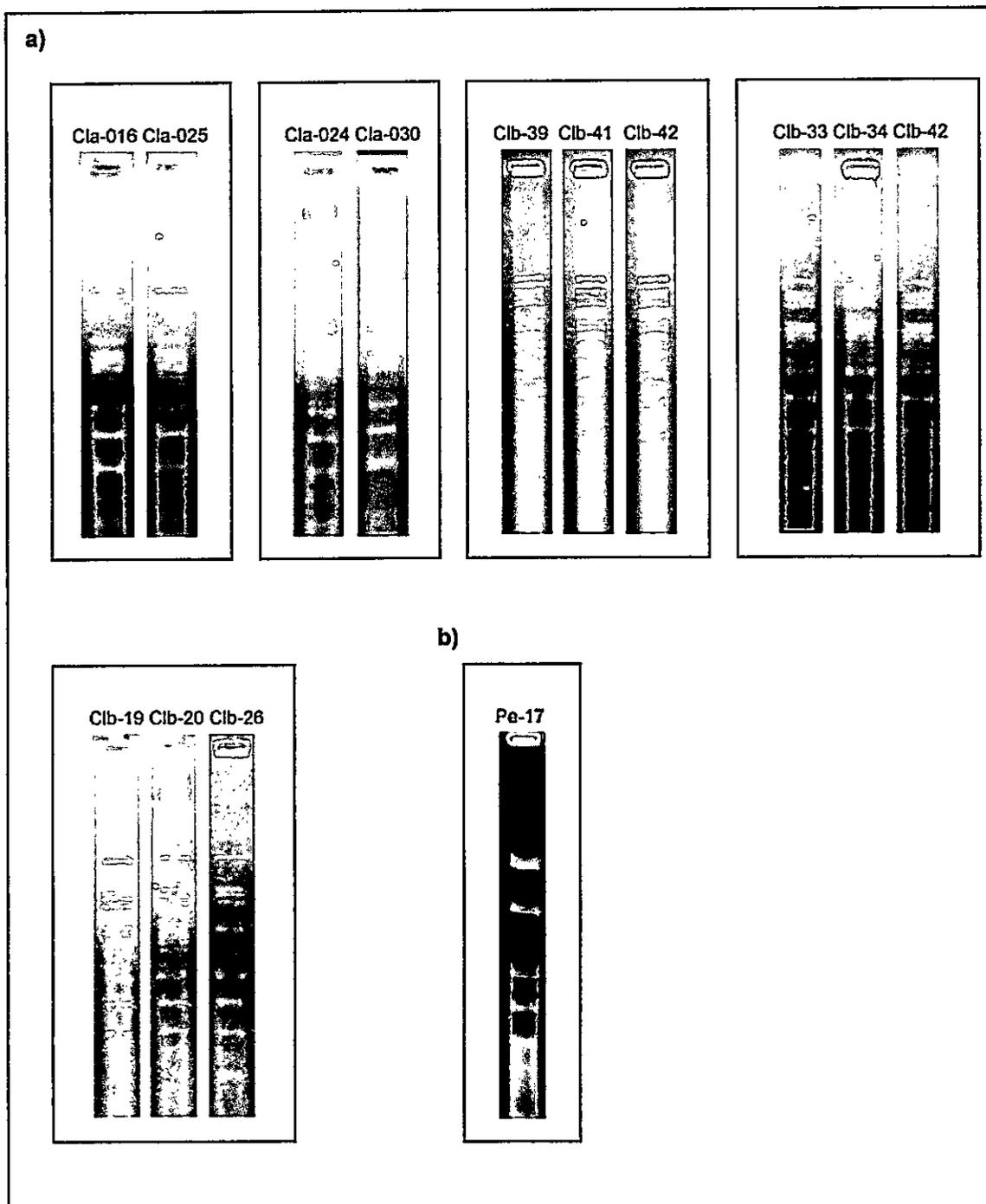
De esta forma, a partir de la matriz de presencia y ausencia de bandas se calculó la disimilitud entre las 299 cepas analizadas por digestión del mtDNA con el coeficiente de Dice. La matriz con las distancias genéticas entre estas cepas se encuentra en el anexo 2 (CD-R). La figura 4 muestra el dendrograma generado a partir de estas distancias con el método UPGMA. Los resultados muestran que sólo existen 7 perfiles de restricción de mtDNA repetidos entre las cepas chilenas y en no más de 2 a 3 veces cada uno, lo que redujo el número de cepas desde 223 a 212, es decir, sólo en un 4,9 %. Dentro de las cepas comerciales se observan 5 perfiles idénticos correspondientes a las cepas 35, 40, 41, 42 y 46 y otros dos de las cepas 32 y 36. Las cepas 35 y 42 corresponden a una cepa recolectada en el valle de Casablanca, Chile, que se está comenzando a comercializar y que fue colocada por duplicado a modo de control. Por su parte, las cepas 32 y 36 corresponden a la misma cepa (UCD 522) comercializada por diferentes empresas y que también sirvieron de control. Sin embargo, las cepas 35 (duplicado cepa 42), 40, 41 y 46 son cepas que se comercializan como cepas diferentes, e incluso las cepas 35 (42), 40 y 41 son comercializadas por la misma empresa.

Figura 4. Dendrograma basado en los perfiles de restricción del mtDNA de 299 aislados de *S. cerevisiae* según el método UPGMA. La escala en la abscisa indica la disimilitud calculada con el coeficiente de Dice. Los colores de las cepas corresponden a su origen geográfico y se mantienen según lo señalado en la figura 3.



En la figura 5a se comparan los perfiles de restricción del mtDNA de aquellos aislados que aparecen como equivalentes en el dendrograma, pudiéndose apreciar que realmente son idénticos. Por otra parte, se encontró un caso donde el perfil de restricción de la cepa Pe-17 difiere visualmente del resto y que en el dendrograma se observa como la más distante, presumiéndose la posibilidad que no pertenezca a la especie *S. cerevisiae* (figura 5b).

Figura 5. Perfiles de restricción del mtDNA. a) Cepas con perfiles idénticos. b) Perfil de restricción de mtDNA de la cepa Pe-17.



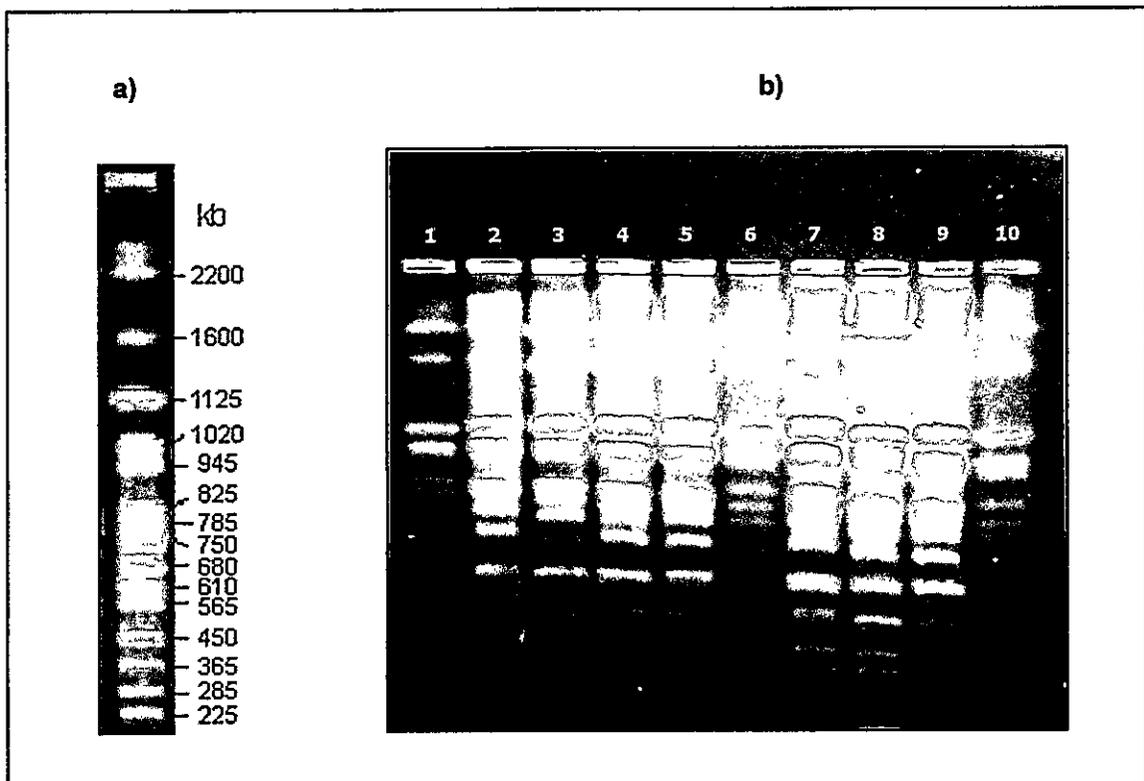
#### 5.4. Cariotipo electroforético

El estudio de la relación filogenética de las cepas de levaduras vínicas mediante el cariotipo por electroforesis de campo pulsado se realizó a un total de 155 cepas (tabla 6). Se eligieron 53 cepas aisladas en Chile que según el análisis de RFLP del mtDNA no estarían relacionadas entre sí. Además, se incluyeron otros 20 aislados nativos involucrados en estudios complementarios de microvinificación para confirmar la idoneidad como cultivos iniciadores (Cla: 016, 017, 018, 020, 025, 063, 090, 092, 098, 101, 117, 132, 147, 149, 150, 157; Clb: 03, 30, 31, 38), pues poseen características enológicas adecuadas a la demanda del mercado, tales como buen poder fermentativo, resistencia al etanol, tiempos cortos de inicio de la fermentación, baja producción de ácidos volátiles, equilibrio en la producción de glicerol frente al etanol, bajo contenido de azúcares residuales, etc. También se incluyeron todas las cepas provenientes desde Perú, Uruguay, España y las comerciales. Los cariotipos electroforéticos obtenidos fueron comparados contra el patrón de la cepa YNN295 de *S. cerevisiae* con el fin de obtener los tamaños de las bandas cromosomales de cada cepa. En la figura 6a se observa el patrón de tamaño cromosomal de *S. cerevisiae*, la cepa YNN295, con los respectivos tamaños en kilobases, mientras que en la figura 6b se muestra un ejemplo del cariotipo electroforético obtenido por campo pulsado para diferentes aislados nativos de *S. cerevisiae*.

**Tabla 6:** Cantidad de levaduras vínicas *S. cerevisiae* analizadas por electroforesis de campo pulsado.

Origen	ECP
Valle del Maule	43
Valle de Curicó	16
Valle del Maipo	14
Perú	21
Uruguay	19
España	21
Comerciales	21
<b>Total</b>	<b>155</b>

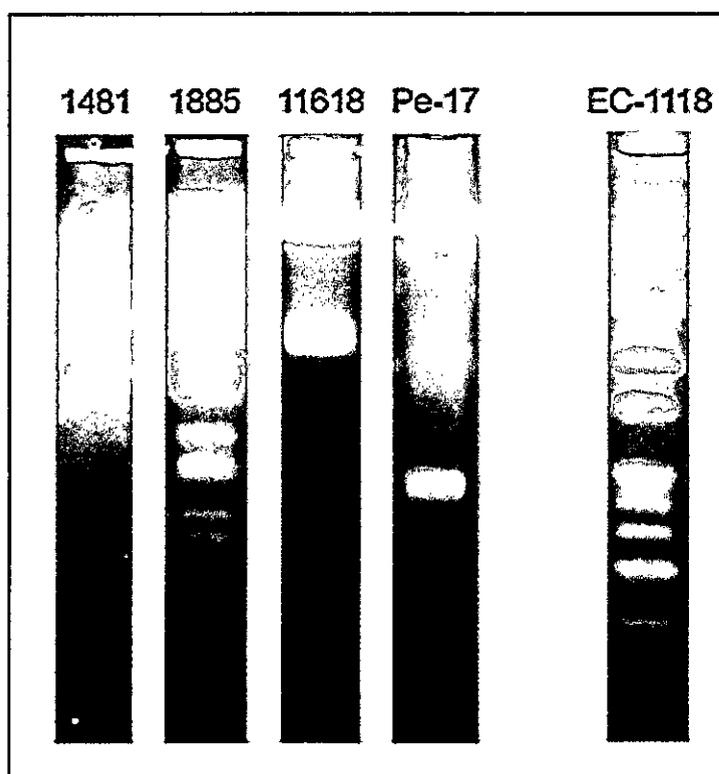
**Figura 6. Cariotipo electroforético por campo pulsado de aislados *S. cerevisiae*.** a) Marcador de tamaño cromosómico para *S. cerevisiae* cepa YNN 295. b) Ejemplo de un gel del cariotipo electroforético por campo pulsado de siete cepas (carriles 2 a 5 y 7 a 9). La cepa tipo de *S. cerevisiae* YNN 295 se utilizó como marcador de tamaño cromosómico (carriles 1, 6 y 10)



Las cepas españolas CECT 1481, 1885, 11618 y la cepa de Perú Pe-17 presentan claramente un cariotipo electroforético que no corresponde a la especie *S. cerevisiae* (figura 7), por lo que, a excepción de Pe-17 que se mantuvo como *outgroup*, se eliminaron del análisis.

La cepa CECT 1885 fue definida como *S. bayanus* o *S. pastorianus* según su patrón de cariotipo electroforético en un estudio realizado por Guillamón y cols. (1996). En este mismo estudio se definió la cepa CECT 1481 como *S. kluyveri* según pruebas de fermentación y asimilación de azúcares. Para identificar molecularmente esta última cepa, así como las cepas CECT 11618 y Pe-17 se realizó un análisis de PCR de la región 5.8S-ITS del rDNA y posterior digestión del producto amplificado con las enzimas de restricción *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI*. Los resultados se resumen en la tabla 7, a partir de los cuales se demuestra la identidad no-*Saccharomyces cerevisiae* de estas levaduras. Según la base de datos para restricción de la región ITS publicada por Esteve-Zarzoso y cols. (1999), la cepa CECT 1481 correspondería a la especie *Tolurasporea delbruekii*. Sin embargo, las cepas CECT 11618 y Pe-17 no pudieron ser identificadas a partir de estos datos. Para identificar la cepa Pe-17 que se mantuvo como *outgroup* se secuenció la región 5.8S-ITS del rDNA, con lo que se pudo determinar que pertenece a la especie *Pichia mexicana*.

**Figura 7. Cepas no-Saccharomyces detectadas por análisis de cariotipo electroforético.** Las cepas españolas CECT 1481, 1885, 11618 y la cepa de Perú Pe-17 no pertenecen a la especie *S. cerevisiae*, pues el patrón de cariotipo electroforético difiere claramente al correspondiente a esta especie. La cepa EC-1118 se incluye como el patrón de la especie *S. cerevisiae*.



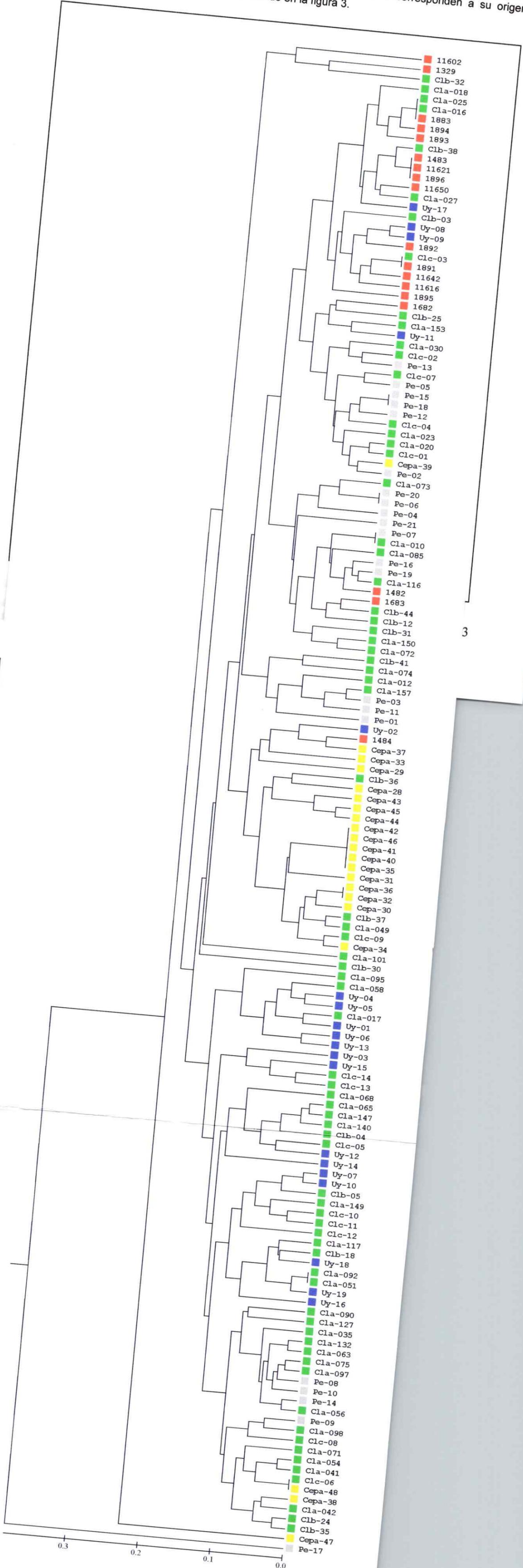
**Tabla 7: Análisis de PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS del rDNA a cepas cuyo cariotipo electroforético no corresponde a la especie *S. cerevisiae*.** El producto de PCR obtenido fue digerido con las enzimas *HaeIII*, *HinfI* y *CfoI*. Se muestran también los tamaños esperados para *S. cerevisiae*.

Denominación	Producto PCR (pb)	<i>HaeIII</i> (pb)	<i>HinfI</i> (pb)	<i>CfoI</i> (pb)
CECT 1481	810	810	420+390	340+230+ 160+110
CECT 11618	520	390+100	230+160+140	210+190+80+60
Pe-17	650	400+150+90	320+320	300+220+80
<i>S. cerevisiae</i>	880	320+230+ 180+150	365+155	385+365

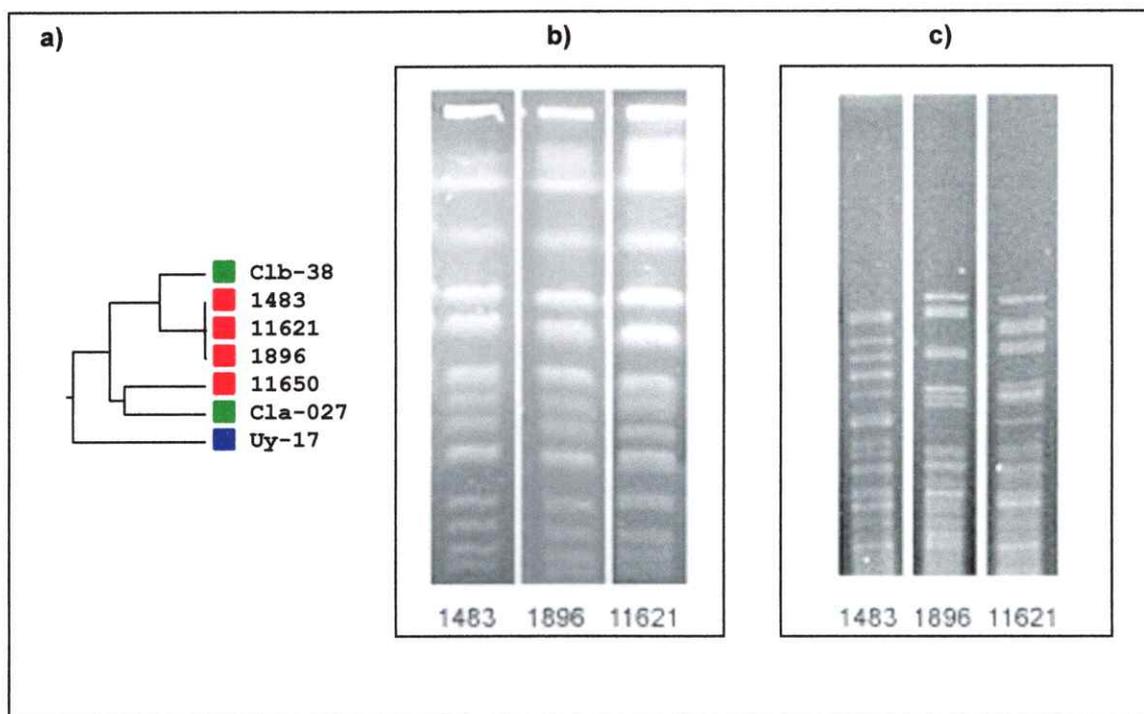
Con los diferentes cariotipos electroforéticos obtenidos se construyó un patrón de tamaño molecular de 30 bandas entre 190 y 2400 kb, contra el cual fueron comparados todos los cariotipos, obteniéndose la matriz de presencia y ausencia de bandas. Las distancias genéticas obtenidas usando el coeficiente de Dice (anexo 3 en CD-R) a partir de la matriz de presencia y ausencia de bandas fueron diagramadas como un árbol de distancia construido con el método UPGMA (figura 8), el cual establece el grado de similitud entre los patrones de cariotipo electroforético de las 152 cepas analizadas.

El dendrograma generado establece como iguales algunos patrones de cariotipo muy similares de cepas consideradas diferentes por el análisis del mtDNA (figura 9), así como cepas que resultan idénticas por ambas metodologías (figura 10). Sin embargo, también se observa que algunos patrones considerados muy similares no son definidos así al ingresarlos a la matriz, lo cual puede deberse a la interpretación del dato o a ligeras diferencias en las condiciones experimentales que hacen que los tamaños de las bandas varíen levemente y al ser comparados contra el patrón general sean consideradas como diferentes (figura 11).

Figura 8. Dendrograma basado en los patrones de cariotipo electroforético de 152 aislados *S. cerevisiae* según el método UPGMA. La escala en la abscisa indica la disimilitud calculada con el coeficiente de Dice. Los colores de las cepas corresponden a su origen geográfico y se mantienen según lo señalado en la figura 3.



**Figura 9. Comparación de tres cepas que presentan cariotipo electroforético similares y perfiles de restricción del mtDNA distintos. a)** Extracto del dendrograma realizado con los datos de cariotipo electroforético, donde se observan 3 cepas idénticas. **b)** Cariotipo electroforético de las 3 cepas consideradas idénticas en el análisis de datos. **c)** Perfiles de restricción de estas cepas.



**Figura 10. Aislados de levadura con sus perfiles de restricción del mtDNA y de cariotipo electroforéticos idénticos. a)** Extracto del dendrograma con los datos de RFLP del mtDNA donde aparecen 5 cepas comerciales idénticas, junto a sus respectivos perfiles de restricción. **b)** Extracto del dendrograma con los datos de cariotipo electroforético donde aparecen las mismas cepas comerciales como idénticas, junto a sus respectivos patrones de cariotipo.

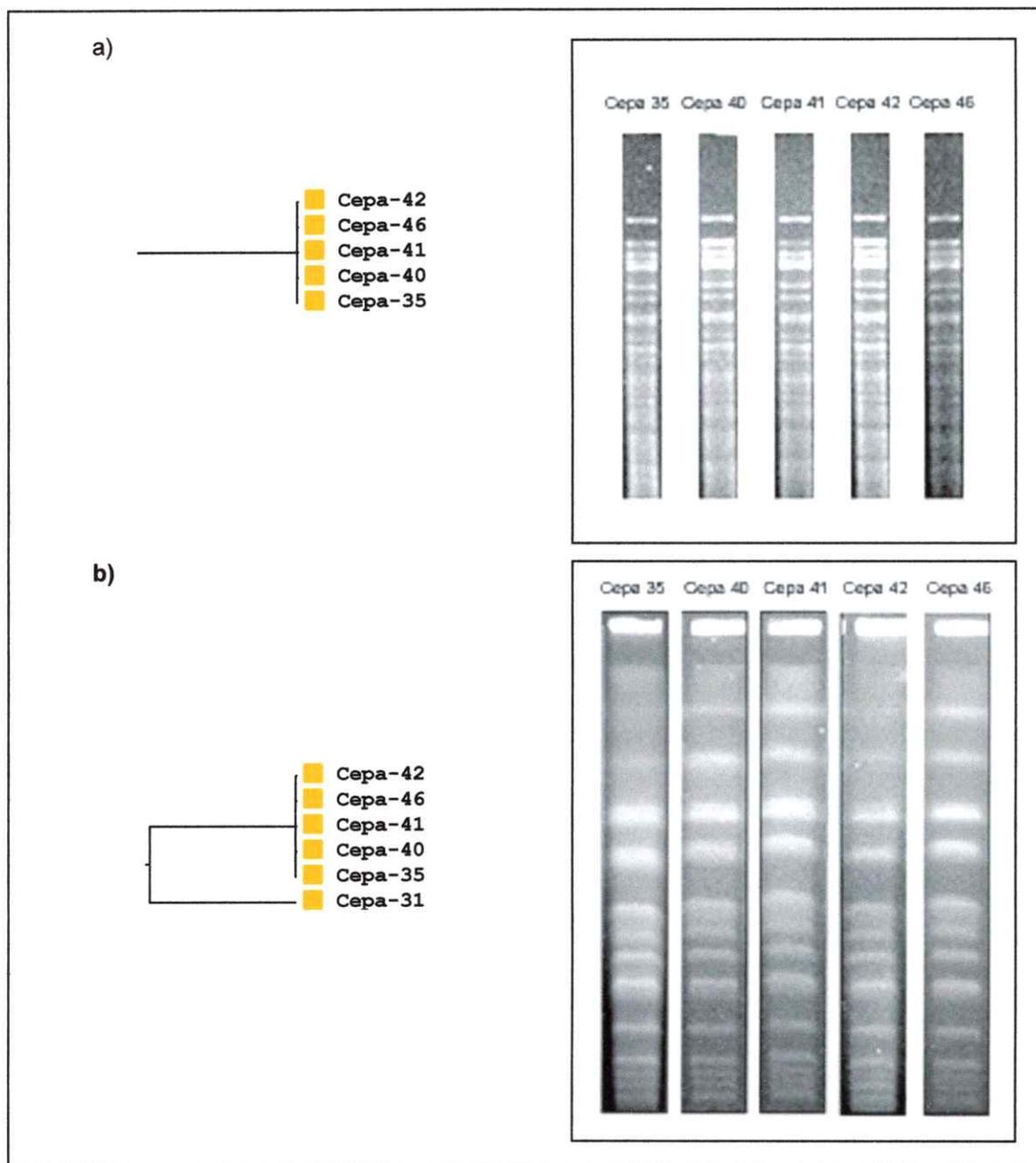
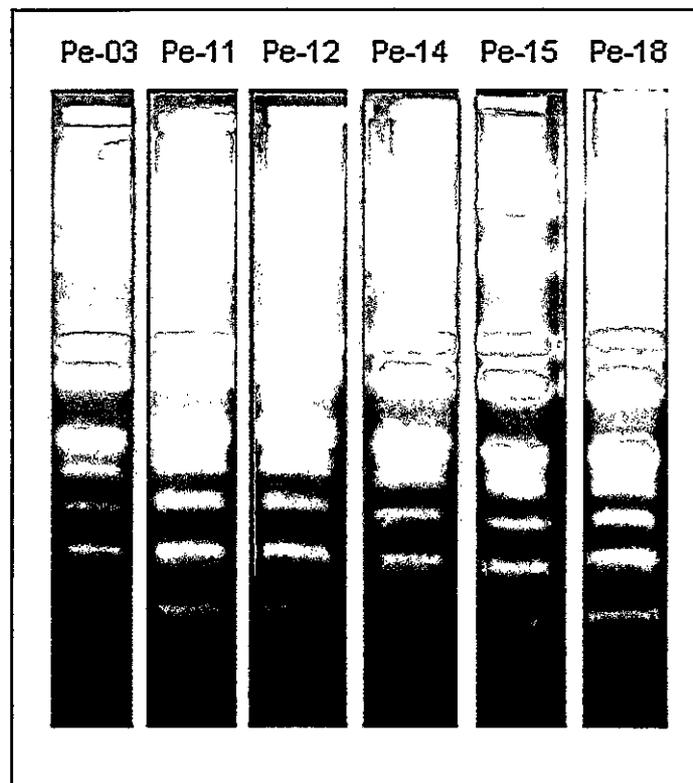
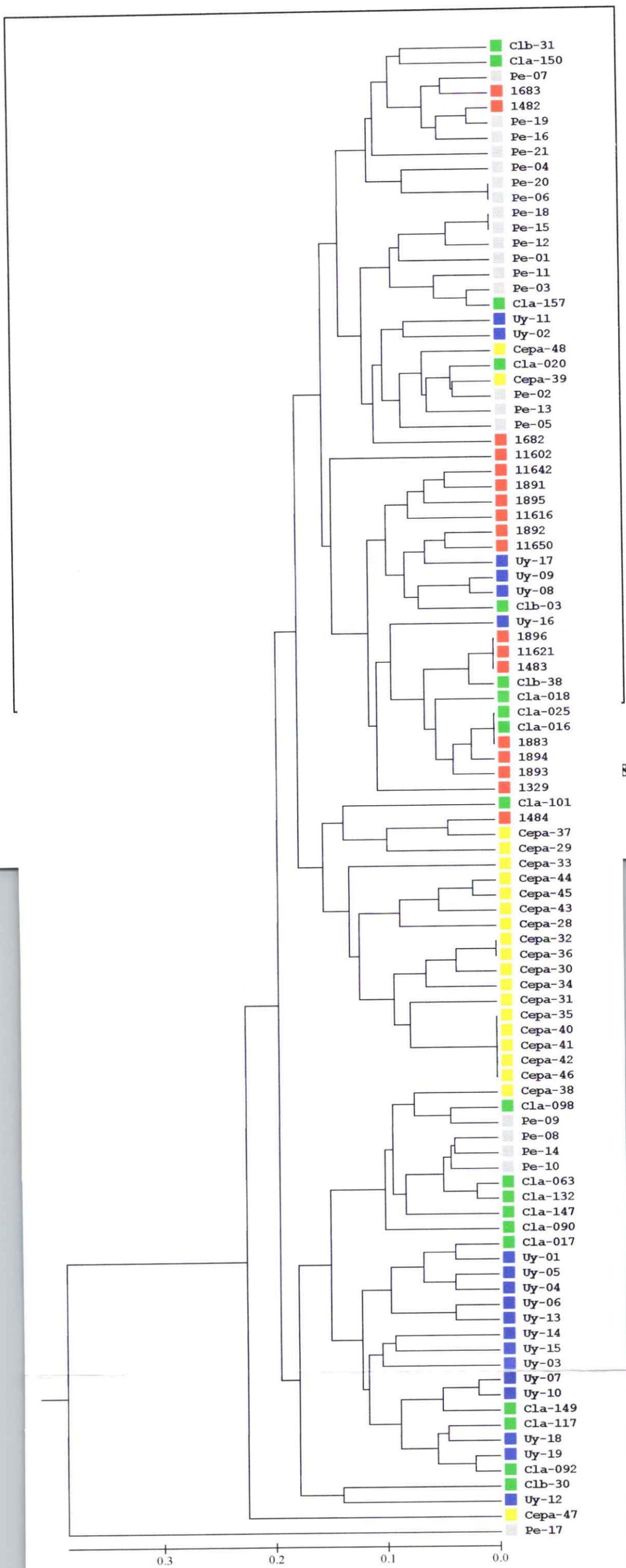


Figura 11. Aislados con cariotipos electroforéticos idénticos, pero no idénticos en el dendrograma.



El dendrograma generado con los datos de distancia genética obtenidos a partir de la comparación de los cariotipos electroforéticos muestra una diferenciación de las cepas según su origen, en especial para las cepas comerciales, españolas y peruanas. Pero con el fin de comparar en igual proporción las cepas aisladas en Chile con las de otras procedencias, ya que las cepas aisladas en Chile corresponden al 48,02 % del total de cepas analizadas (73 cepas de un total de 152), se decidió reducir el número de éstas a uno similar al de los otros orígenes. Para esto, se tomaron sólo las 20 cepas involucradas en estudios complementarios de propiedades fermentativas y organolépticas anteriormente señaladas. En este dendrograma se puede apreciar más claramente la existencia de una diferenciación por origen geográfico entre las cepas antes señaladas (figura 12). Las cepas aisladas en Chile no muestran una clara separación, pero el mayor grupo se encuentra en la rama del árbol donde predominan las cepas aisladas en Uruguay y que representa una rama totalmente distinta a la que pertenecen los otros tres grupos de cepas. Aún cuando no sabemos la escala de tiempo con la que estamos midiendo esta distancia, la mayor similitud entre los patrones de cepas provenientes de una misma región se podría deber a que éstas derivan de un antecesor común y comparten una historia evolutiva.

Figura 12. Dendrograma basado en los patrones de cariotipo electroforético de 99 aislados *S. cerevisiae* según el método UPGMA. Sólo se incluyeron 20 cepas recolectadas en Chile. La escala en la abcisa indica la disimilitud calculada con el coeficiente de Dice. Los colores de las cepas corresponden a su origen geográfico y se mantienen según lo señalado en la figura 3.



## 5.5. RAPD-PCR

Inicialmente se probó el grado de polimorfismo obtenido para 3 cepas de *S. cerevisiae* (A: Clc-05, B: Clc-07, C: CECT 1329) con 27 partidores de los *kit 10 mer* para RAPD de Operon Technologies pertenecientes a las series AC, AD, AE y AF. De estos se seleccionaron 12 partidores que entregaron el mayor grado de polimorfismo entre las cepas (tabla 8). Con estos partidores se evaluó el grado de polimorfismo de 48 cepas diferentes de *S. cerevisiae* mediante la técnica de RAPD, junto con la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* que se utilizó como *outgroup*. Se eligieron al azar 15 cepas provenientes de Perú, Uruguay y España (5 de cada origen), 4 cepas comerciales y 30 cepas chilenas, entre las que se incluyeron 5 cepas del valle del Maipo, las 20 cepas chilenas que fueron utilizadas en estudios complementarios de fermentación por sus propiedades de interés enológico y otras 5 cepas chilenas elegidas al azar (tabla 9).

Como el análisis de RAPD es utilizado frecuentemente en estudios de relación genética intraespecies (Baleiras Couto y cols., 1996; Pérez y cols., 2001; Lin y cols., 1996; Wang y cols., 1998), fue utilizado en este estudio con la finalidad de contrastar estos resultados con aquellos obtenidos con los datos de cariotipo electroforético.

**Tabla 8:** Partidores utilizados para el análisis de RAPD y sus secuencias nucleotídicas correspondientes.

Denominación	Partidores	Secuencia
P1	OPAD 08	5'GGC AGG CAA G3'
P2	OPAD 11	5'CAA TCG GGT C3'
P3	OPAD 14	5'GAA CGA GGG T3'
P4	OPAE 09	5'TGC CAC GAG G3'
P5	OPAE 10	5'CTG AAG CGC A3'
P6	OPAE 12	5'CCG AGC AAT C3'
P7	OPAE 13	5'TGT GGA CTG G3'
P8	OPAE 15	5'TGC CTG GAC C3'
P9	OPAE 20	5'TTG ACC CCA G3'
P10	OPAF 02	5'CAG CCG AGA A3'
P11	OPAF 06	5'CCG CAG TCT G3'
P12	OPAF 10	5'GGT TGG AGA C3'

**Tabla 9: Cantidad de levaduras analizadas por RAPD.**

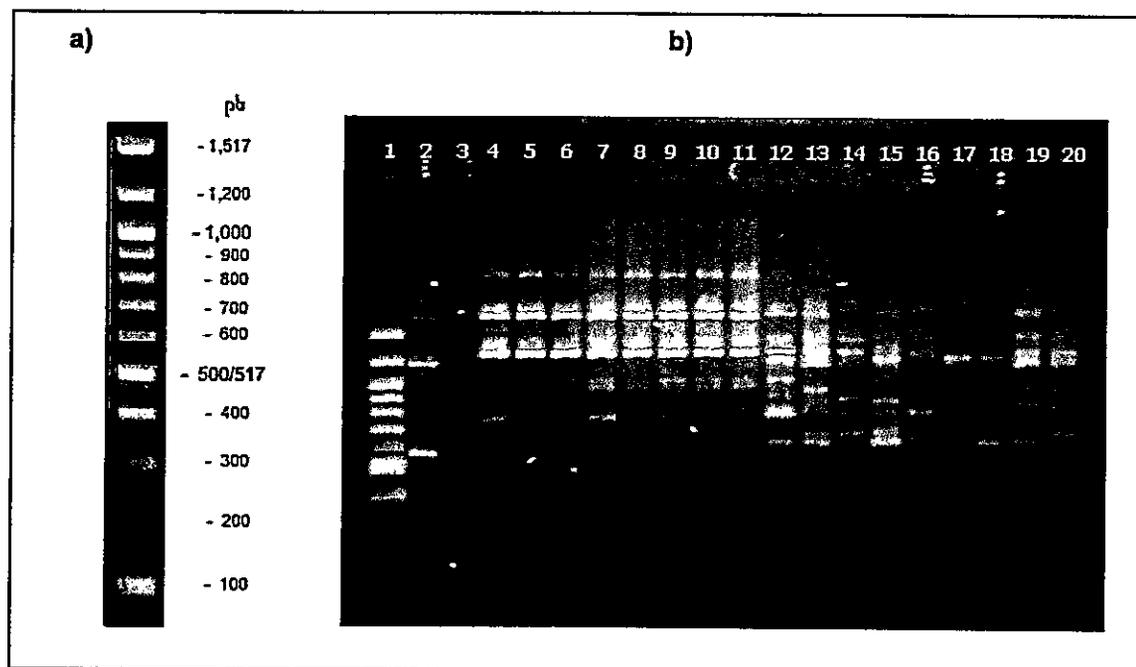
<b>Origen</b>	<b>RAPD</b>
Maule	18
Curicó	6
Maipo	5
Perú	5
Uruguay	5
España	5
Comerciales	4
<i>X. dendrorhous</i>	1
<b>Total</b>	<b>49</b>

Utilizando como marcador una escala de 100 pb se determinó el tamaño de las bandas polimórficas generadas. En la figura 13a se muestra la escala de 100 pb utilizada y en la figura 13b un ejemplo de un gel de electroforesis con muestras de los productos de la amplificación al azar realizada a 19 muestras de DNA correspondientes a diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

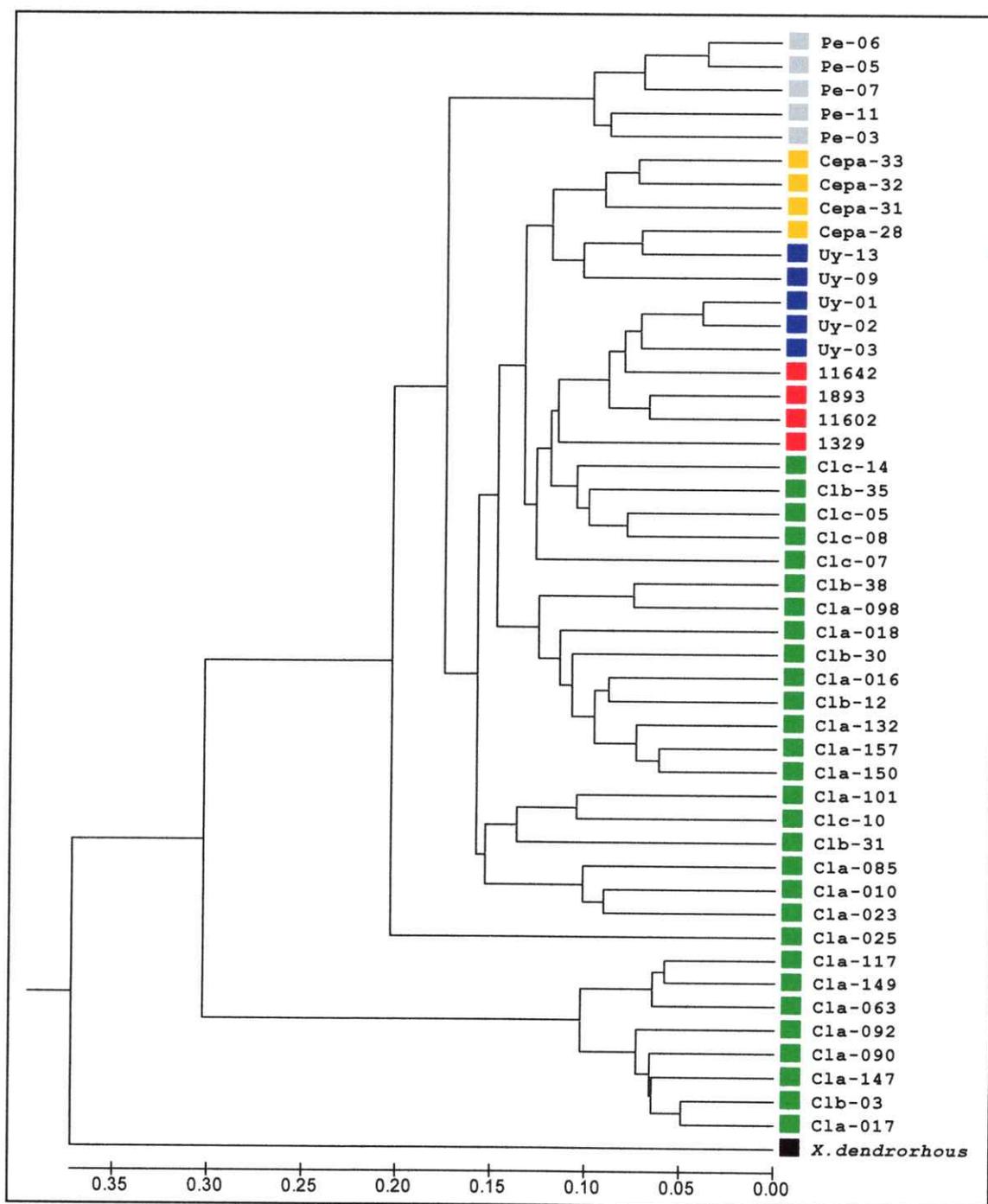
Los perfiles de los fragmentos amplificados obtenidos para cada cepa con los distintos partidores fueron sumados a modo de generar un solo perfil por cepa. Estos perfiles fueron comparados con un patrón general construido a partir de la suma de todas las bandas polimórficas resultantes de las 49 cepas. Este patrón general posee 173 bandas (entre 250 y 3000 pb) y con él se construyó la matriz de presencia y ausencia de bandas, la cual fue convertida en una matriz de distancia usando el coeficiente de similitud de Dice (anexo 4 en CD-R). La figura 14 muestra el dendrograma obtenido usando el método UPGMA. Se muestra una separación entre las cepas de distintos orígenes, destacando un grupo de cepas aisladas en Chile que se encuentran totalmente separadas del resto.

La cepa española CECT 1885 fue eliminada del dendrograma generado a partir del análisis de RAPD, debido a que resultaba muy apartada de las cepas que pertenecen a la especie *S. cerevisiae*. En el análisis de cariotipo también se observó que esta cepa presenta un patrón diferente a la especie *S. cerevisiae* y en un estudio realizado por

**Figura 13. Análisis de RAPD a cepas de *S. cerevisiae*.** a) Escala de DNA de 100 pb como marcador de tamaño molecular b) Ejemplo de un gel de RAPD de 19 cepas (carriles 2 al 20) utilizando un partidor decamérico de la serie de Operon Technologies. El marcador de DNA de escala 100 pb se utilizó como patrón de tamaño (carril 1).



**Figura 14. Dendrograma basado en los análisis de RAPD de 47 cepas *S. cerevisiae* según el método UPGMA. La cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, en color negro, fue utilizada como *outgroup*. La escala en la abcisa indica la disimilitud calculada con el coeficiente de Dice. Los colores de las cepas corresponden a su origen geográfico y se mantienen según lo señalado en la figura 3.**

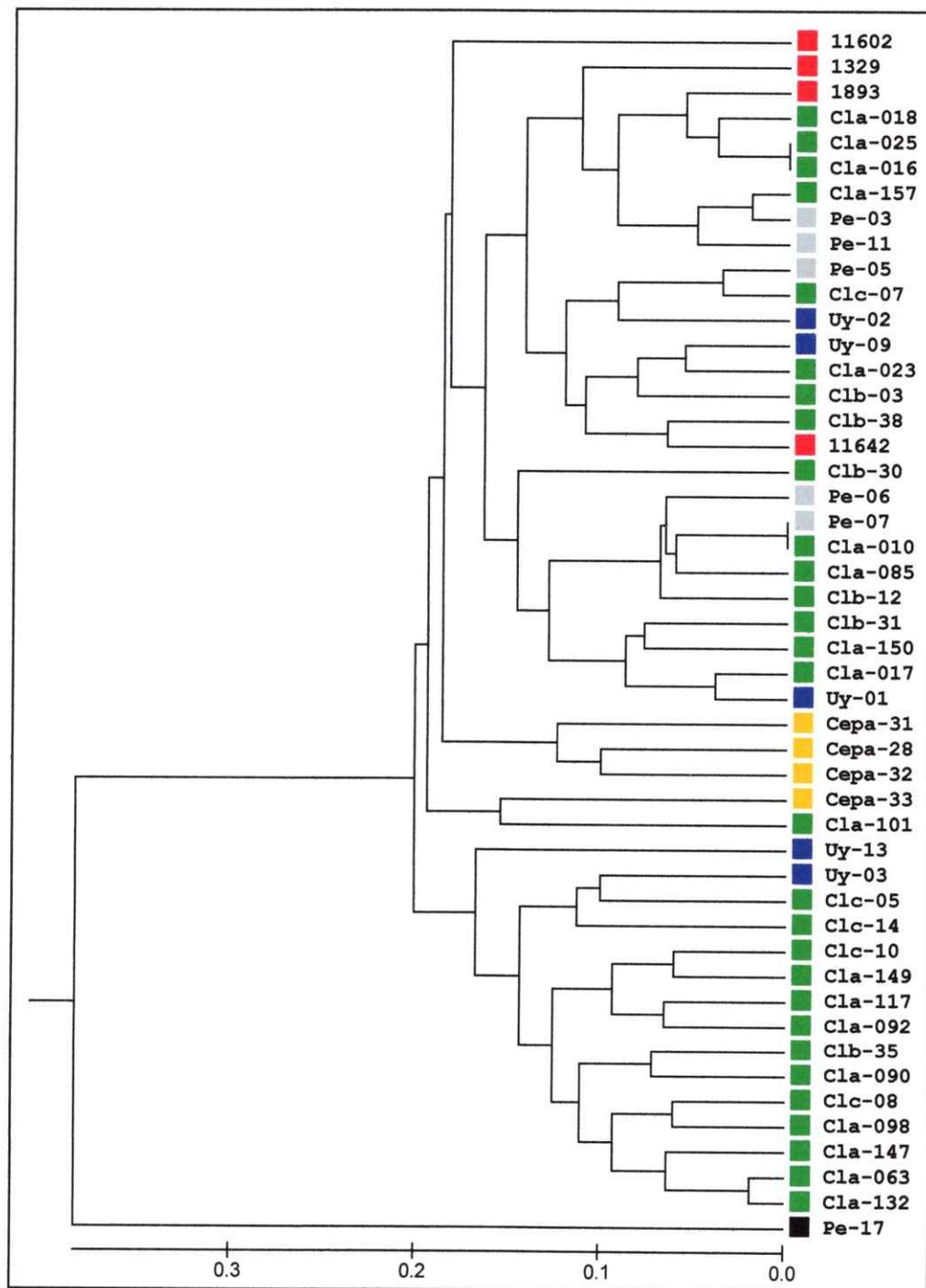


Guillamón y cols. (1996) se determinó que corresponde a la especie *S. bayanus* o *S. pastorianus*.

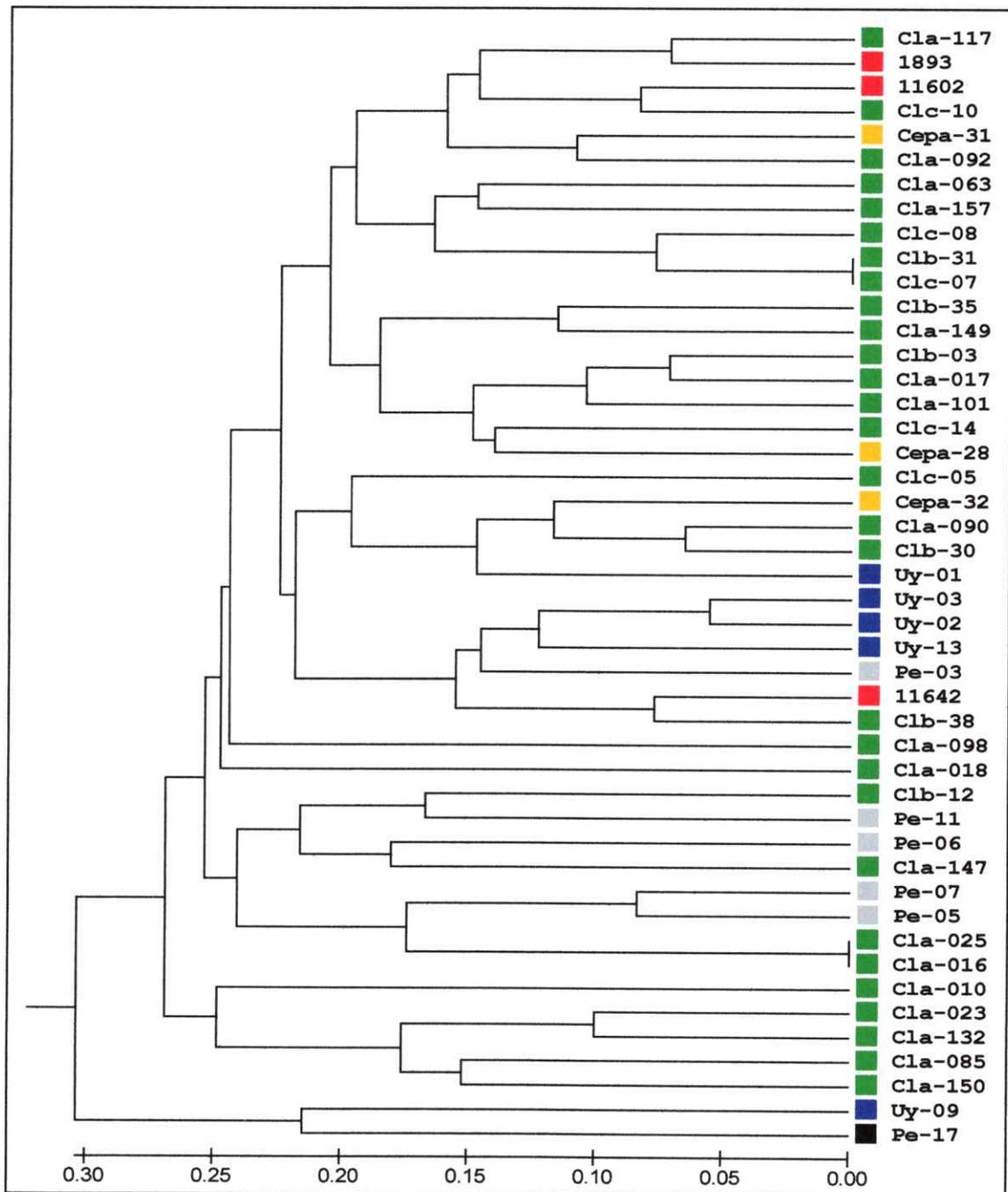
Utilizando las mismas cepas incluidas para análisis de RAPD se construyó un dendrograma con los datos del análisis de cariotipo electroforético (Figura 15), aunque como *outgroup* se utilizó la cepa Pe-17 en vez de *X. dendrorhous*. Al comparar ambos dendrogramas podemos visualizar que las relaciones genéticas representadas por cada uno son diferentes y que la similitud entre los cariotipos no se corresponde con la similitud obtenida con RAPD. Sin embargo, el dendrograma con los datos de cariotipo también muestra agrupaciones de cepas en correlación con el origen geográfico y se observa un grupo de cepas de Chile separadas de todas las demás. Incluso este grupo contiene a seis de las cepas de Chile (Cla-063, Cla-090, Cla-092, Cla-117, Cla-147, Cla-149) que se encuentran también en un grupo más separado en el dendrograma obtenido a partir de los datos de RAPD.

Cuando se toman los datos de distancia obtenidos a partir de los perfiles de restricción del mtDNA de las mismas cepas utilizadas para el análisis de RAPD (salvo la cepa CECT-1329, que no fue analizada por esta técnica) y se construye el dendrograma (figura 16), se pierde el grado de correlación entre el origen geográfico y la similitud de los perfiles que se observa en el dendrograma completo (figura 4) y aunque se observan algunas agrupaciones de similitud correlacionadas con el origen geográfico, las

**Figura 15. Dendrograma basado en los patrones de cariotipo electroforético de las 47 cepas *S. cerevisiae* utilizadas en análisis de RAPD, según el método UPGMA. En este caso se utilizó Pe-17 como *outgroup* (color negro). La escala en la abcisa indica la disimilitud calculada con el coeficiente de Dice. Los colores de las cepas corresponden a su origen geográfico y se mantienen según lo señalado en la figura 3.**



**Figura 16. Dendrograma basado en los perfiles de restricción de mtDNA de 46 cepas *S. cerevisiae* utilizadas en análisis de RAPD, según el método UPGMA. Se utilizó Pe-17 como *outgroup* (color negro). La escala en la abcisa indica la disimilitud calculada con el coeficiente de Dice. Los colores de las cepas corresponden a su origen geográfico y se mantienen según lo señalado en la figura 3.**



correlaciones no son equivalentes con las obtenidas por RAPD o por cariotipo electroforético, donde éstas son mucho más claras.

## **6. DISCUSIÓN**

### 6.1. Diversidad de cepas *Saccharomyces cerevisiae* en Chile.

La selección de levaduras vínicas es desarrollada en varios países vitivinícolas, tales como Francia, España, Italia, Sudáfrica, Australia y Estados Unidos, con el fin de obtener cepas representativas de estas regiones para su uso industrial (Esteve-Zaroso y cols., 2000; Querol y cols., 1992b; Versavaud y cols., 1995). El uso de levaduras propias de una zona geográfica o autóctonas se fundamenta en que éstas estarían mejor adaptadas a las condiciones de sustrato y fermentación de la zona vitivinícola de producción, permitiendo disminuir problemas como enlentecimiento o paradas de fermentación, así como otorgar a los vinos con ellas producidos una identidad particular y característica de la región de elaboración (Querol, 2000).

En general, los estudios realizados en este sentido se han llevado a cabo aislando levaduras desde zonas vitivinícolas poco intervenidas y procesos de vinificación tradicional, puesto que en estas zonas es mayor la posibilidad de encontrar levaduras autóctonas que en aquellas zonas donde se utilizan frecuentemente levaduras comerciales. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que es importante comprobar que las levaduras obtenidas en programas de colecta y selección de levaduras para uso industrial sean autóctonas y no correspondan a levaduras comerciales o cepas recientemente derivadas de éstas por fenómenos del tipo microevolución (Soll y cols,

2000), las cuales se ha visto pueden imponerse en las instalaciones industriales (Constantí y cols, 1997; Mariconda y cols., 2001; Sabate y cols., 2002).

Mediante análisis molecular de restricción del mtDNA realizado a un elevado número de levaduras recolectadas en este estudio, se logró evidenciar la amplia diversidad de cepas de la levadura *S. cerevisiae* presente en los valles vitivinícolas del Maule y Curicó. Mediante la inspección visual de los perfiles de digestión del mtDNA se encontró que alrededor de un 30 % de las colonias de levaduras aisladas corresponden a biotipos distintos de *S. cerevisiae* (285 cepas distintas de un total de 925 colonias analizadas, tabla 3).

Las variaciones de la microbiota de *S. cerevisiae* entre áreas vitivinícolas distintas tienen relación con diferencias en las condiciones climáticas de cada una de ellas, como pluviosidad o temperatura, con la variedad de uva y con las diferentes técnicas de vinificación utilizadas (Charoenchai y cols., 1998; Epifanio y cols., 1999; Longo y cols., 1991; Parrish y Carrol, 1985). En este sentido, una menor diversidad de cepas de la levadura *S. cerevisiae* aisladas en el valle de Curicó podría estar relacionada con el uso de técnicas que pueden reducir la diversidad de cepas silvestres, como la aplicación de funguicidas, la sulfitación del mosto o, eventualmente, la inoculación del mosto con levaduras comerciales, técnicas menos frecuentes en el valle del Maule.

En este sentido, cuando se analizaron los datos de biodiversidad según el valle de origen de los aislados de levaduras, se obtiene un  $32,6 \pm 18,3$  % de cepas distintas en el valle del Maule en comparación con un  $27,9 \pm 17,8$  % de cepas distintas en el valle de Curicó (tabla 3). Un análisis más detallado de los lugares de colecta indican que en el valle del Maule no todas las áreas muestreadas producen sus vinos de un modo artesanal; de la misma forma, en el valle de Curicó no todas las áreas de colecta están cercanas a zonas industriales. Por ello y con el fin de verificar si las diferencias entre estos valles tienen relación con el tipo principal de prácticas vitivinícolas que en ellos se realizan, se comparó la diversidad de cepas *S. cerevisiae* según el área de origen del mosto desde donde fueron aisladas, considerando mostos provenientes de áreas de producción tradicional (valle del Maule) y áreas de producción industrial (valle de Curicó). Las viñas de producción vitivinícola tradicional comprendieron 8 áreas del valle del Maule, de las 11 áreas muestreadas y presentaron una diversidad de cepas del  $37,7 \pm 13,0$  %; mientras que las áreas de producción industrializada del valle de Curicó comprenden a 5 de las 9 muestreadas y presentan un  $26,7 \pm 5,7$  % de cepas diferentes (tabla 4). Las diferencias en el porcentaje de diversidad de biotipos al utilizar este criterio aumentaron, mostrando que en las áreas artesanales existe un mayor número de cepas que en las áreas industriales. Esto podría estar relacionado al uso profuso de cepas comerciales como cultivos iniciadores de la fermentación, lo que junto con la adición de anhídrido sulfuroso, influiría sobre la biodiversidad de cepas silvestres de levaduras *S. cerevisiae*.

Si consideramos que en este estudio las levaduras recolectadas provienen desde mostos fermentados espontáneamente, esto es, del jugo de uva sin aditivos, podemos asumir que la menor diversidad de levaduras en los viñedos donde existe un mayor uso de anhídrido sulfuroso y levaduras comerciales, podría además estar influenciada por la práctica común de utilizar los desechos de vinificación como abono de campo. En este sentido, en las áreas industriales se estaría diseminando en el campo cepas de levaduras comerciales en alta concentración, muchas de las cuales poseen características fisiológicas, como por ejemplo el fenotipo *killer*, que le podrían permitir tener una ventaja frente a las levaduras nativas, permitiéndoles imponerse en bodegas y viñedos.

## **6.2. Marcadores genéticos de *Saccharomyces cerevisiae* a nivel intraespecífico.**

En este estudio se utilizaron tres técnicas diferentes para analizar las cepas vínicas de *S. cerevisiae*: el análisis de los perfiles de restricción del mtDNA, el análisis de los patrones de cariotipo electroforético y el análisis de los patrones de RAPD. Estas técnicas entregan una caracterización de las cepas en la forma de patrones de bandas electroforéticas, por lo que el tratamiento de los datos obtenidos por cada una de ellas se

realizó de manera similar. Con ellas se buscó diferenciar cada cepa y analizar la existencia de una correlación entre la similitud de sus patrones y el origen geográfico desde el que provienen, con el objeto de tener un criterio cuantitativo para identificar cepas de levaduras autóctonas de Chile.

El análisis de los perfiles de restricción del mtDNA y de los patrones de cariotipo electroforético son herramientas ampliamente utilizadas en la diferenciación e identificación de cepas vínicas de *S. cerevisiae* (Benítez y cols., 1996; Nadal y cols., 1996; Querol y cols., 1992a). Algunos estudios han encontrado diferencias en la capacidad resolutive de ambas técnicas. Por ejemplo, Vezinhet y cols. (1990) estudiaron 22 aislados diferentes y encontraron 17 perfiles de restricción de mtDNA y 20 patrones de cariotipo electroforético distintos, logrando diferenciar mediante sus cariotipos electroforéticos 3 pares de cepas con perfiles de restricción idénticos. Versavaud y cols. (1995) encontraron tanto cepas con perfiles de restricción de mtDNA idénticos, pero leves diferencias en su cariotipo, como también cepas con cariotipos muy similares, pero perfiles de restricción de mtDNA muy diferentes. Asimismo, en un estudio realizado en nuestro laboratorio (datos no publicados), se analizaron por ambos métodos 49 cepas vínicas de *S. cerevisiae* aisladas en el valle del Maipo, obteniéndose 22 perfiles de restricción de mtDNA y 31 patrones de cariotipo, encontrándose tanto cepas con igual perfil de restricción de mtDNA y distinto cariotipo, como cepas con cariotipos muy similares y perfiles de restricción diferentes. A pesar que estas diferencias observadas

hacen sugerir la conveniencia de utilizar ambas técnicas en conjunto para así determinar aquellos aislados que corresponden a cepas iguales, esto sería muy laborioso y costoso debido el gran número de aislados ha analizar.

De esta forma, se utilizó la digestión del mtDNA, que es rápida y sencilla, para diferenciar las cepas vnicas de *S. cerevisiae* entre la gran cantidad de aislados recolectados en Chile. A través de un análisis visual de los geles de electroforesis obtenidos para el estudio de 939 aislados, esta técnica permitió seleccionar aquellos que tenían perfiles de restricción de mtDNA diferentes, lo que fue utilizado como criterio para establecer las distintas cepas. De esta forma, se identificaron 299 perfiles de restricción de mtDNA diferentes, según lo cual sólo alrededor de un 30 % de las levaduras aisladas en Chile corresponderían a cepas diferentes (tabla 2).

Con el objeto de hacer el análisis independiente del criterio del experimentador, se procedió a caracterizar cada patrón de bandas según su tamaño molecular obtenido mediante el programa Quantity One (Bio-Rad). Este análisis computacional es representado en la figura 4 mediante un dendrograma, en el cual se observa el análisis de los perfiles de restricción de mtDNA que se realizó a 223 cepas de Chile y donde se obtuvo que entre estas cepas habían aún aislados con igual perfil de restricción del mtDNA, reduciéndose los patrones diferentes a 212. Además, este análisis muestra que no hubo cepas de Chile que tuviesen un perfil idéntico a alguna de las 76 cepas de otros

orígenes analizadas y sólo dentro de las cepas comerciales hubo perfiles idénticos (cepa 35 con cepa 40, cepa 41 y cepa 46). Dentro de las cepas comerciales que poseen un mismo perfil de restricción se encuentran los controles de cepas idénticas que se utilizaron (cepa 35 con cepa 42 y cepa 32 con cepa 36).

A partir del análisis computacional de los datos de digestión del mtDNA, se seleccionaron 53 cepas de Chile para realizar análisis de cariotipo. Otras 20 cepas aisladas en Chile se incluyeron debido a que presentaban propiedades fermentativas y enológicas de interés comercial. Además, se incluyeron 81 cepas de otros orígenes geográficos. Así, mediante el análisis de los patrones de cariotipo se obtuvieron 71 patrones diferentes de las 73 cepas de Chile que fueron ensayadas. Un par de estos aislados con cariotipos idénticos también poseen perfiles de restricción de mtDNA idénticos (cepas Cla-016 y Cla-025, incluidas por sus propiedades fermentativas y enológicas). También se obtuvieron dos pares de cepas que a pesar de presentar cariotipos iguales fueron posibles de diferenciar por sus perfiles de restricción de mtDNA (Cla-051 con Cla-092 y Clc-06 con cepa 48). Debido a que de preferencia se utilizaron cepas con diferentes perfiles de digestión del mtDNA para el análisis de cariotipo electroforético, no fue posible evaluar la presencia de cepas con perfiles de restricción de mtDNA idénticos y diferentes patrones de cariotipo electroforético.

La posibilidad de diferenciar cepas que poseen un mismo cariotipo electroforético mediante sus perfiles de restricción podría explicarse por una mayor tasa de cambio en el mtDNA o que esta técnica permite detectar pequeños cambios en este genoma, que en el caso del cariotipo no son posible de evidenciar. Sin embargo, como ya se señaló anteriormente también se han reportado casos donde es posible diferenciar cepas que poseen un mismo perfil de restricción de mtDNA mediante diferencias en sus cariotipos electroforéticos. Es por esto, que se debe considerar que como la evolución del genoma mitocondrial es independiente de la del genoma nuclear es posible que la obtención de cepas con iguales perfiles de restricción de mtDNA y diferentes patrones de cariotipo o al inverso pueda deberse a que éstas correspondan a cepas provenientes de un linaje común, pero que uno de sus genomas a sufrido cambios.

Además, con el análisis de los patrones de cariotipo electroforético, al igual que por el análisis de los perfiles de restricción de mtDNA, se obtuvo que las cepas comerciales 35, 40, 41 y 46 poseen patrones de cariotipo electroforético idénticos y también aparecen idénticos los controles utilizados. Esto evidencia la utilidad de estas herramientas moleculares para determinar la identidad de cepas y evaluar si una empresa comercializa una misma cepa de levadura como diferente (cepas comerciales 35, 40 y 41). En relación a esto, un estudio realizado por Fernández-Espinar y cols. (2001) demostró mediante análisis de restricción de mtDNA, cariotipo electroforético y amplificación por PCR de secuencias  $\delta$ , que de 45 cepas vínicas de *S. cerevisiae*

comercializadas por distintas empresas sólo 30 pudieron ser diferenciadas, por lo que evidencia la necesidad de probar la autenticidad de estas cepas por métodos moleculares.

La agrupación de la mayor parte de las cepas comerciales en una misma rama de los dendrogramas obtenidos por estos dos análisis, demuestra la capacidad del análisis molecular para agrupar cepas originarias de una misma región geográfica (Francia). Es importante destacar que si bien algunas cepas comerciales incluidas en este estudio fueron seleccionadas por institutos o universidades de otros países y se encuentran en sus ceparios, como sucede con la cepa 38 seleccionada por el Instituto Geisenheim de Alemania, la cepa 31 del Instituto de Investigación del Vino de Australia (AWRI) y las cepas 32 y 36 de la Universidad de Davis – California, nosotros mediante la comunicación con estos institutos o con los proveedores logramos saber que estas cepas fueron aisladas en áreas vitivinícolas de Francia. En el caso de la cepa 28, seleccionada en Australia, no se tiene certeza de su origen (I.S. Pretorius, comunicación personal) y como en nuestros análisis moleculares se agrupa con las cepas comerciales aisladas en Francia, es posible que también provenga de dicho país. En este sentido, tenemos el caso de la cepa 35 (y su duplicado cepa 42) que fue aislada en Chile y es actualmente comercializada para uso industrial, pero que se agrupa con las cepas de origen francés, mostrando patrones idénticos de digestión de mtDNA y cariotipo electroforético a las cepas 40, 41 y 46 (figura 10). Por el contrario, la cepa Uy 04 aislada en Uruguay y la cepa CECT-1894 aislada en España, que también son cepas actualmente

comercializadas, se agrupan con las cepas de su mismo origen geográfico, lo que confirmaría que son cepas autóctonas de dichas regiones.

Por otra parte, se obtuvo que la cepa Pe-17 presentaba patrones diferentes al de *S. cerevisiae* tanto en la digestión de su mtDNA (figura 5) como para su cariotipo electroforético (figura 7), lo que se evidencia a través de los análisis de clúster como la cepa más lejana en los dendrogramas generados. Mediante los patrones de cariotipo se pudo establecer que las cepas obtenidas del Catálogo Español de Cultivos Tipos CECT 1481 y CECT 1885 no pertenecerían a la especie *S. cerevisiae* como son clasificadas en él. Guillamón y cols. (1996) también realizaron esta observación, pero las cepas aún no han sido recatalogadas. Además, nuestro análisis indica que la cepa CECT 11618 tampoco pertenecería a la especie *S. cerevisiae*. La identificación de la cepa Pe-17 (que se mantuvo como *outgroup*) se realizó mediante la secuenciación de la zona 5.8S-ITS del rDNA, obteniéndose que pertenece a la especie *Pichia mexicana*.

No se puede obviar el hecho que los análisis computacionales de los patrones electroforéticos obtenidos tanto por la digestión del mtDNA como por el cariotipo electroforético identificaron algunas cepas como idénticas siendo que éstas no lo serían. De la misma forma, cepas que aparecen computacionalmente como distintas, la comparación visual de sus patrones indica que estos aislados corresponderían a la misma cepa. En ambas situaciones se manifiestan limitaciones en la automatización del proceso

de lectura de los geles que debe ser considerada al momento de hacer el análisis. Esto se discute en detalle en la sección 6.3.

El método de RAPD no es considerado una herramienta adecuada realizar una diferenciación de cepas de *S. cerevisiae* de forma rápida y a un bajo costo para un elevado número de cepas. Esto debido a que el polimorfismo entregado en una sola reacción es limitado, por lo que para lograr una adecuada diferenciación intraespecífica, se requiere combinar la información obtenida desde varias reacciones con partidores distintos. En este trabajo, mediante el uso de 12 partidores se logró diferenciar 47 cepas de *S. cerevisiae* analizadas y 2 cepas que pertenecen a otras especies.

### **6.3. Validez del análisis de los datos de polimorfismo para determinar la relación genética de cepas vínicas *Saccharomyces cerevisiae* de distintos orígenes.**

La naturaleza exacta del polimorfismo encontrado en los genomas mitocondrial y nuclear mediante las técnicas de digestión del mtDNA y cariotipo electroforético aún es desconocida. Sin embargo, se ha sugerido que la constante adaptación a las fuertes condiciones industriales a las que estas cepas son sometidas podría ser la causa de esta

elevada heterogeneidad (Benítez y cols., 1996; Codón y cols., 1998; Hauser y cols., 2001; Nadal y cols., 1996).

Por su parte, Longo y Vezinhet (1993) encontraron que las cepas silvestres de *S. cerevisiae* presentan constantes reorganizaciones cromosómicas durante la mitosis. Asimismo, Puig y cols. (2000) no encontraron evidencias que las cepas vínicas de *S. cerevisiae* sufrieran meiosis durante la fermentación, tal vez debido a que usualmente estas levaduras son aneuploides. Estos autores proponen que los mecanismos que generan polimorfismo ocurren durante la reproducción vegetativa de las levaduras. En conjunto esto es coherente, debido a que la recombinación mitótica generaría una rápida adaptación al medioambiente y la ploidía de las cepas vínicas les conferiría una ventaja, por ejemplo, en la adaptación a variables ambientales o al aumentar la dosis de ciertos genes de importancia para la fermentación.

De esta forma, si las levaduras se reproducen clonalmente y se adaptan constantemente al ambiente que habitan, evidenciando esto en su genoma, entonces estas técnicas podrían permitir obtener una relación entre la similitud genética de las cepas y su origen ecológico/geográfico. El aislamiento geográfico o ecológico es uno de los mecanismos involucrados en el proceso de especiación (Rundle y cols., 2000) por ser una barrera al flujo genético, por lo que aquellas cepas originarias de un mismo

microambiente, serán más similares entre sí que con aquellas provenientes de otros orígenes geográficos.

Se han realizado pocos estudios para evaluar si existe alguna correspondencia entre la similitud de los patrones electroforéticos y el origen geográfico de las cepas, sin embargo, los resultados no han sido definitivos. Mientras Versavaud y cols. (1995) no obtuvieron una correlación entre la similitud de los perfiles de restricción del mtDNA y el origen geográfico de cepas aisladas de una misma región vitivinícola francesa, Guillamón y cols. (1996) sí observaron la existencia de una correlación entre la distancia genética y el origen geográfico o ecológico de cepas *S. cerevisiae* aisladas de diferentes regiones vnicas españolas. Por su parte, Nadal y cols. (1996) encontraron una fuerte correlación entre ciertos fenotipos de interés enológico, como tolerancia al etanol, capacidad de flocular y de utilizar galactosa como única fuente de carbono, y determinados perfiles de restricción de mtDNA.

Como en el presente trabajo se utilizaron cepas recolectadas en distintos países, nosotros esperábamos que la amplia separación geográfica entre los orígenes de las cepas se tradujera en una marcada correlación entre la similitud de los patrones electroforéticos y el origen geográfico de éstas. Esto debiera ser especialmente válido para los datos obtenidos por la técnica de cariotipo electroforético, ya que la acumulación de rearrreglos cromosómicos puede tener implicancias en el proceso de

especiación en algunas levaduras (Fischer y cols., 2000). Sin embargo, tanto para el análisis de restricción del mtDNA como para el cariotipo electroforético la correlación no fue marcada, aunque si se observan agrupaciones de cepas que provienen de un origen común, lo que se aprecian mejor en el caso del análisis de los patrones de cariotipo electroforético cuando se disminuyeron las cepas aisladas en Chile a un número similar al de las cepas provenientes de los otros orígenes (figura 12).

Benítez y cols. (1996), han sugerido que los genomas mitocondriales de levaduras industriales se ven fuertemente influenciados por las condiciones particulares de cada ambiente industrial. En el caso de las levaduras vínicas, esto se vería reflejado en una alta tasa mutagénica producto del efecto del etanol sobre este genoma. Este fenómeno, junto a una mayor sensibilidad de la técnica de restricción del mtDNA para evidenciar cambios en la estructura del DNA, podrían generar una pérdida de correlación entre diferencias genéticas a nivel del mtDNA y el origen geográfico de las levaduras al aumentar la probabilidad que ocurra convergencia evolutiva. Sin embargo, no se han evidenciado casos de cambios de perfiles de restricción del mtDNA durante el transcurso de una fermentación y las reales implicancias del etanol en el polimorfismo mitocondrial de las cepas vínicas *S. cerevisiae* todavía no son concluyentes.

Otros factores que podrían estar implicados en la falta de una correlación entre los análisis moleculares y el origen geográfico tienen relación con la gran similitud de

los patrones electroforéticos que exhiben las cepas vínicas de *S. cerevisiae* y al tipo de tratamiento otorgado a estos datos. Así, primero tenemos que ambas técnicas confieren pocos marcadores (la digestión del mtDNA generó 26 bandas totales y el cariotipo electroforético generó 30) y estos marcadores se encuentran muy próximos entre sí, es decir, los tamaños moleculares de las bandas son muy contiguos. Esto, junto al elevado número de muestras, donde todas poseen patrones electroforéticos muy similares, provoca que la capacidad resolutive de estas técnicas sea baja. Por esto, la construcción de las matrices de ausencia y presencia de bandas según los tamaños de éstas fue muy difícil de generar.

Estas dificultades se demuestran en la imposibilidad de evitar, mediante este análisis de los patrones electroforéticos, tanto la subestimación como la sobreestimación de pequeñas diferencias en los tamaños de las bandas. De esta forma, al revisar los dendrogramas generados se observan inconsistencias, como la obtención de cepas con patrones de cariotipo idénticos (CECT 1483 con CECT 1896 y CECT 11621, Clc-03 con CECT 1891, Pe-06 con Pe-20, Pe-07 con Cla-010 y 1883 con Cla-016) cuando realmente tienen pequeñas diferencias que no pudieron ser valoradas en el análisis debido a que el tamaño de las bandas correspondieron al mismo rango de tamaño de acuerdo al patrón generado. Por el contrario, si modificamos el patrón de referencia con el objeto que estas cepas se diferencien, otro número mayor de cepas quedan mal catalogadas. También, cepas que visualmente presentan perfiles de restricción de

mtDNA y patrones de cariotipo idénticos (Pe-03, Pe-11, Pe-12, Pe-14, Pe-15 y Pe-18, figura 11), son considerados distintas al realizar el dendrograma a partir de los datos computacionales debido a que pequeñas diferencias en la asignación de tamaño de algunas de sus bandas implicaron que éstas quedarán en distintos rangos de tamaño.

Una forma de disminuir este error sería realizando toda la comparación de los patrones visualmente, para decidir cuales son idénticos y, posteriormente, realizar una matriz de acuerdo a la posición que se observa de las bandas. Esto evitaría la rigidez del criterio dado por los tamaños moleculares obtenidos por el programa computacional. El problema de este tipo de análisis es que es muy laborioso y complicado cuando se dispone de un elevado número de muestras y, además, impide la adición directa a la matriz de muestras posteriores, haciendo necesaria la comparación con patrones ya introducidos para decidir las posiciones de las nuevas bandas.

Tal vez aumentando los marcadores o marcando las diferencias de los patrones electroforéticos entre las cepas podría también mejorarse la correlación de las cepas con su origen geográfico. En el caso del cariotipo electroforético esto se lograría, por ejemplo, cambiando las condiciones de corrida de la electroforesis de campo pulsado para separar mejor las bandas de menor tamaño (que son las que presentan mayor polimorfismo), de modo que las diferencias en tamaño de las bandas polimórficas sean más evidentes. En el caso de la digestión del mtDNA, se podría digerir con otras

enzimas que también otorguen polimorfismo intraespecífico, de modo de sumar los marcadores obtenidos con cada enzima.

A pesar de las limitaciones encontradas en la valoración de las bandas que alteran en cierto grado las relaciones genéticas que existen entre las cepas ensayadas, no se puede obviar que también se observan relaciones que validan el análisis realizado. Partiendo por los controles de cepas idénticas utilizados (cepa 35 con cepa 42 y cepa 32 con cepa 36), que por ambos análisis aparecen como una misma cepa. Del mismo modo ocurre, tanto con las cepas comerciales 35, 40, 41 y 46 como con dos levaduras recolectadas en Chile (Cla-016 con Cla-025), que presentan perfiles de restricción de mtDNA y patrones de cariotipo electroforético idénticos y se observan como la misma cepa en los dendrogramas.

El análisis de los patrones electroforéticos obtenidos por ambos métodos, y principalmente por cariotipo electroforético, permite obtener cierta correlación entre la distancia genética de las cepas con su origen geográfico al identificar entre un gran número de muestras aquellos aislados que son muy similares o idénticos en sus patrones electroforéticos. Además, permite ingresar nuevos datos y manipular con cuales cepas se quiere comparar, de esta forma se pueden contrastar nuevos aislados de Chile con las cepas comerciales, con el fin de verificar que no se haya recolectado una cepa que ya está siendo comercializada.

En el caso del análisis de los patrones de RAPD, se observa una marcada diferenciación según el origen de las cepas. Como ya se ha señalado, esta técnica es una representación de las diferencias entre las secuencias nucleotídicas de las zonas complementarias a los partidores en todo el genoma y se requieren varias reacciones con distintos partidores para lograr diferenciar cepas de levadura. La sumatoria de todos los patrones electroforéticos obtenidos para cada cepa permite disponer de una gran cantidad de marcadores (173 bandas electroforéticas), lo que aumenta la capacidad de diferenciar claramente las cepas. Igualmente, el polimorfismo obtenido es más marcado que con las otras técnicas, en el sentido que los patrones electroforéticos no son tan similares entre las cepas como en el caso del mtDNA y el cariotipo. En general, las bandas electroforéticas obtenidas no se encuentran tan contiguas, lo que permite generar una matriz de presencia y ausencia de bandas más confiable.

Sería adecuado también en este método, utilizar como control alguna cepa por duplicado y que sean ensayadas de modo independiente, para así corroborar y dar validez al análisis realizado. En este trabajo, se incluyeron en RAPD dos cepas silvestres aisladas en Chile que habían resultado con idénticos patrones de digestión de mtDNA y cariotipo (Cla-016 con Cla-025), pero que diferencias en sus secuencias produjeron patrones de RAPD diferentes. Sin embargo, estas cepas no corresponden a un aislado puesto por duplicado, sino a dos aislados diferentes, por lo que es posible que posean

ciertas diferencias nucleotídicas a nivel de secuencia que no modifican los patrones electroforéticos obtenidos mediante la digestión del mtDNA ni el cariotipo electroforético.

Según los resultados obtenidos en esta tesis, el análisis de los patrones electroforéticos obtenidos por RAPD parece ser la manera más apropiada para estudiar las relaciones genéticas entre las cepas vínicas de *S. cerevisiae*, ya que otorga una diferenciación clara y marcada de las cepas según su origen. El problema de esta técnica es la baja reproducibilidad que posee, lo que debe tratar de reducirse estandarizando las condiciones de reacción, siendo muy cuidadosos al realizar estos ensayos y utilizando en distintas reacciones controles de cepas por duplicado.

No se puede tampoco dejar de reconocer que si bien el análisis de cariotipo no presentó la marcada correlación obtenida con RAPD, sí se presentan agrupaciones que se observan claramente en el dendrograma donde se disminuyeron las cepas recolectadas en Chile a un número similar al de las cepas de los otros orígenes (figura 12). Por lo que, la similitud de los patrones de cariotipo sí están reflejando la cercanía genética de las cepas y como se ha señalado ya, un ajuste del tratamiento de los datos obtenidos por esta técnica podría mejorar el análisis de los mismos, de modo de hacer esta técnica una herramienta útil para determinar la distancia genética entre cepas vínicas de *S. cerevisiae*.

#### **6.4. Carácter autóctono de cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* colectadas en Chile.**

El análisis de los patrones electroforéticos obtenidos por las tres técnicas moleculares aplicadas nos han permitido obtener información acerca de la diversidad de las cepas recolectadas en Chile.

De acuerdo con de los perfiles de restricción del mtDNA y de los patrones de cariotipo electroforético, la cepa comercial 35 aislada desde viñedos Chardonnay del valle de Casablanca en Chile y seleccionada por el Departamento de Agroindustria y Enología de la Universidad de Chile (DSM oenology) no corresponde a una cepa autóctona de Chile y aparece como idéntica a otras cepas comerciales (cepa 40, 41 y 46) que son utilizadas en diversas viñas. Cabe destacar que, las cepas 35, 40 y 41 son comercializadas como diferentes por la misma empresa y la cepa 46 es una de las cepas comerciales más ampliamente utilizadas en varias regiones vitivinícolas del mundo (Lallemand).

A pesar que no existen datos públicos que asocien a la cepa 35 con publicaciones disponibles para conocer el procedimiento y criterio experimental para su aislamiento y selección como levadura nativa, un grupo de investigación del Departamento de

Agroindustria y Enología de la Universidad de Chile publicaron un trabajo, donde Said y cols. (1999) realizaron una recolección de levaduras nativas desde mosto Chardonnay del valle de Casablanca, Chile y las seleccionaron según sus propiedades fisiológicas y enológicas. Las cepas elegidas fueron comparadas mediante cariotipo electroforético con cepas de laboratorio. La importancia de determinar molecularmente el carácter autóctono de las cepas silvestres aisladas en Chile quedaría con este caso manifiesta, al sugerir que existe la probabilidad que cepas comerciales utilizadas en las viñas se impongan en las bodegas de las mismas o colonicen los viñedos cuando prácticas enológicas que facilitan la dispersión de estas levaduras son realizadas, posibilitando así que cepas comerciales sean recolectadas y seleccionadas como cepas nativas.

Además, esta evaluación molecular debiera realizarse de forma previa a la selección de levaduras por análisis acerca de sus propiedades fisiológicas, enológicas y organolépticas para conducir las fermentaciones del mosto y producir un vino de calidad, como propone también Esteve-Zarzoso y cols. (2000), debido a que de esta forma se evitaría el análisis de cepas que ya están siendo comercializadas o de aislados que corresponden a una misma cepa.

En relación a esto, en un estudio realizado por Schütz y Gafner (1994) se encontró, entre cepas aisladas desde fermentaciones espontáneas de mostos de distintas variedades de uva y de años diferentes, la presencia de tres cepas con patrones de

cariotipo electroforético muy similares al de la cepa comercial W27 de Lallemand. Lo que indica que en otras regiones vitivinícolas del mundo la determinación del carácter autóctono de las cepas silvestres recolectadas también puede tomar relevancia.

Finalmente, en este trabajo se obtuvo cepas recolectadas en Chile que se encuentran lejanas en cuanto a distancia genética con las cepas de otros orígenes y sobre todo con las cepas comerciales y forman un claro clúster. Estas cepas que aparecen claramente separadas y agrupadas pueden ser definidas como cepas propias de nuestro país o autóctonas. Destaca entre estas un grupo de cepas (Cla-063, Cla-090, Cla-092, Cla-117, Cla-147, Cla-149) que tanto por el análisis de cariotipo electroforético como por RAPD dan agrupadas sólo con cepas recolectadas en Chile y en un clúster separado de cepas de otros orígenes. Además, la gran mayoría de las cepas de Chile analizadas por RAPD se encuentran en grupos independientes al de las cepas de otros orígenes.

La evaluación del carácter autóctono de las cepas silvestres de *S. cerevisiae*, como la realizada en este estudio, puede ser relevante para la producción de vinos completamente elaborados con materias primas de la región de origen, lo que puede ser utilizado como estrategia comercial, por ejemplo, en la producción de vinos orgánicos.

Debido a que nuestros resultados sugieren que la técnica de RAPD representa la mejor aproximación para correlacionar las características genómicas de las levaduras

vínicas con su origen geográfico, sería interesante incrementar el número de cepas vínicas aisladas en Perú, Uruguay, España y otros orígenes, así como de cepas comerciales, con el fin de verificar si esta correlación se mantiene. Además, se podría evaluar la capacidad del análisis de RAPD para diferenciar las cepas aisladas en Chile según la subregión vitivinícola desde donde fueron recolectadas, es decir, estudiar si existe también una correlación entre la distancia genética y el origen geográfico para cepas pertenecientes a distintas áreas de una misma región.

La gran cantidad de datos moleculares generados a partir de este estudio puede servir para determinar la presencia de cepas encontradas en mayor frecuencia en una subregión o de cepas que se encuentran ampliamente diseminadas en alguna de las regiones estudiadas, las cuales podrían ser preferencialmente analizadas enológica, ya que, además de ser autóctonas, serían representativas de dicha subregión o región. De esta forma, si se obtiene una diferenciación de las cepas según el valle de origen y a la vez cepas representativas de ellos, estas cepas potencialmente permitirían no sólo producir vinos con todos los beneficios del uso de cepas seleccionadas, si no también producir vinos con características particulares de dicho valle vitivinícola (cepa autóctona del valle) y poder obtener mayores variaciones sensoriales de éstos según el valle de producción vinícola.

## **7. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en este trabajo y el análisis de éstos permiten concluir que:

- Las técnicas de digestión del mtDNA y de cariotipo electroforético permiten una diferenciación simple y confiable de las cepas vínicas de *S. cerevisiae*.
- La comparación de los perfiles de restricción del mtDNA es una herramienta útil para evaluar la diversidad genética de las cepas *S. cerevisiae* presentes en distintas áreas vitivinícolas. Además podría permitir evaluar la presencia de cepas representativas en la región. Esto es particularmente importante, debido a que la elección adecuada de las cepas que serán seleccionadas como cultivos iniciadores debe realizarse teniendo conocimiento de la microbiota de levaduras implicadas en la vinificación.
- Es importante realizar una evaluación molecular de las cepas silvestres, antes de realizar pruebas enológicas y de fermentación conducentes a selección de levaduras para ser utilizadas como cultivos iniciadores, para evitar seleccionar cepas que ya están siendo comercializadas y también para evitar el análisis de aislados que corresponden a la misma cepa.
- El uso de herramientas moleculares permite obtener nuevos procedimientos de análisis enológico, con el fin de evaluar la calidad de los insumos microbiológicos para la industria del vino.

- La similitud entre los patrones de cariotipo electroforético es útil para evaluar la distancia genética entre cepas vínicas de *S. cerevisiae*, siendo una técnica sencilla, reproducible y que presenta un elevado polimorfismo a nivel intraespecífico para esta especie. Sin embargo, el análisis de los datos requiere aún ciertas modificaciones para poder establecer de forma confiable y clara las relaciones genéticas que existen entre las cepas.
- El análisis de RAPD parece ser la técnica más adecuada para definir las relaciones genéticas entre estas cepas, pero deben manejarse cuidadosamente las condiciones de reacción para minimizar los problemas de reproducibilidad inherentes a esta técnica.
- Las técnicas de análisis molecular evaluadas en esta tesis pueden ser utilizadas para la evaluación del carácter autóctono de aislados silvestres de levaduras para vinificación.

## **8. REFERENCIAS**

1. ARTEHISTORIA. 2002. Vida cotidiana en Egipto: Alimentación. [en línea] <<http://www.artehistoria.com/historia/contextos/249.htm>> [consulta: 25 mayo 2002].
2. BALEIRAS COUTO, M.M., EIJSMA, B., HOFSTRA, H., HUIS IN'T VELD, J.H. y VAN DER VOSSEN, J.M. 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assing genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 62(1): 41-46.
3. BARRÍA, C. 2000. Cauquenes como zona ecológica protegida. [en línea] Chilevinos. Contenidos: columnistas. 31 de Mayo de 2000. <[http://www.chilevinos.com/chilevinos/revista/articulos\\_detalle.aspx?idnoticia=57596DD1-1B99-444F-86F0-80C2B074A5F2](http://www.chilevinos.com/chilevinos/revista/articulos_detalle.aspx?idnoticia=57596DD1-1B99-444F-86F0-80C2B074A5F2)> [consulta: 26 de junio de 2002].
4. BELLOCH, C., BARRIO, E., URUBURU, F., GARCÍA, M.D. y QUEROL, A. 1997. Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 20: 397-408.
5. BENÍTEZ, T., MARTÍNEZ, P. y CODÓN, A.C. 1996. Genetic constitution of industrial yeast. *Microbiología SEM* 12: 371-384.
6. BORDEU, E. y SCARPA, J. 1998. Densidad, extracto seco y cenizas. En: Análisis químico del vino. Santiago, Chile. Ediciones Universidad Católica de Chile. pp.159-172. (Serie Textos Universitarios, Facultad de Agronomía).
7. BOUIX, M. y LEVEAU, J.Y. 2000. Las levaduras: El genoma. En: Microbiología industrial, los microorganismos de interés industrial. Zaragoza, España. Editorial Acribia, S.A. pp.63-78.
8. BRIONES, A.I., UBEDA, J.F. Y GRANDO, M.S. 1996. Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting musts according to their karyotype patterns. *International Journal of Food Microbiology* 28: 369-377.

9. BROACH, J.R., JONES, E.W. y PRINGLE, J.R. (Eds.). 1991. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*, Vol. 1: Genome dynamics, protein synthesis and energetics. Cold Spring Harbor, New York, USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp.344-347.
10. CADEZ, N., RASPOR, P., DE COCK, A.W.A.M., BOEKHOUT, T., y SMITH, M. TH. 2002. Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. FEMS Yeast Research 1(4): 279-289.
11. CARRO, D. y PIÑA, B. 2000. Identificación de cepas de levadura de interés enológico. [en línea] ACE Revista de Enología 3: 10-14  
<[http://www.acenologia.com/ciencia52\\_1.htm](http://www.acenologia.com/ciencia52_1.htm)> [en consulta: 30 julio 2002].
12. CHAROENCHAI, C.; FLEET, G.H. y HENSCHKE, P. 1998. Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeast. American Journal of Enology and Viticulture 49(3): 283-288.
13. CHATELLIER, S., GOTTSCHALK, M., HIGGINS, R., BROUSSEAU, R. y HAREL, J. 1999. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. Journal of Clinical Microbiology 37 (2): 362-366.
14. COSTA, V. CHILEVINOS. 2001. Panorama vitivinícola 2001. [en línea] Chilevinos. Contenidos: Especiales. 17 de Mayo de 2001  
<[http://www.chilevinos.com/chilevinos/revista/articulos\\_detalle.aspx?idnoticia=3377B6EF-CC9C-4F93-85E2-D1E3685A69FF](http://www.chilevinos.com/chilevinos/revista/articulos_detalle.aspx?idnoticia=3377B6EF-CC9C-4F93-85E2-D1E3685A69FF)> [consulta: 26 junio 2002].
15. CHILEVINOS. 1996a. Viñas chilenas. Breve reseña histórica: En la conquista y en la colonia. [en línea]  
<[http://www.chilevinos.com/chilevinos/vinas/vinas\\_historia.aspx](http://www.chilevinos.com/chilevinos/vinas/vinas_historia.aspx)> [consulta: 26 Junio 2002].
16. CHILEVINOS. 1996b. Viñas chilenas. Breve reseña histórica: Las vides de Chile, un patrimonio de la humanidad. [en línea]

- <[http://www.chilevinos.com/chilevinos/vinas/vinas\\_historia.aspx#cuatro](http://www.chilevinos.com/chilevinos/vinas/vinas_historia.aspx#cuatro)>  
[consulta: 26 junio 2002].
17. CLEMONS, K.V., FERROZE, F., HOLMBERG, K. y STEVENS, D.A. 1997. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology* 35(6): 1332-1336.
  18. CODÓN, A. C., BENÍTEZ, T. y KORHOLA, M. 1998. Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 49(2): 154-163.
  19. COLLADO, Q. 2001. Levaduras y la fermentación alcohólica (II). [en línea] Verema. Mundo del vino: Artículos. 27 noviembre 2001.  
<<http://www.verema.com/opinamos/tribuna/articulos/levaduras02.htm>> [consulta: 01 julio 2002].
  20. CONSTANTÍ, M., POBLET, M., AROLA, L., MAS, A. y GUILLAMÓN, J.M. 1997. Análisis of yeast population during alcoholic fermentation in newly established winery. *American Journal of Enology and Viticulture* 48(3): 339-344.
  21. COSTA, V. 2001. Evolución de las exportaciones. [en línea] Chilevinos. Contenidos: Especiales. 17 de Mayo de 2001.  
<[http://www.chilevinos.com/chilevinos/revista/articulos\\_detalle.aspx?idnoticia=bbb e400b-0785-4a20-9534-c3c52e322576](http://www.chilevinos.com/chilevinos/revista/articulos_detalle.aspx?idnoticia=bbb e400b-0785-4a20-9534-c3c52e322576)> [consulta: 26 junio 2002].
  22. DE BARROS LOPES, M., SODEN, A., MARTENS, A.L., HENSCHKE, P.A. y LANGRIDGE, P. 1998. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48(1): 279-286.
  23. DSM Oenology. Ficha del producto Fermicru®LVCB. [en línea]  
<[http://www.dsm-oenology.com/upload/ecommerce/sp/FermicruLVCB\\_sp.pdf](http://www.dsm-oenology.com/upload/ecommerce/sp/FermicruLVCB_sp.pdf)>  
[consulta: 27 agosto 2002].

24. EPIFANIO, S.; GUTIÉRREZ, A.R.; SANTAMARÍA, P. y LÓPEZ, R. 1999. The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* 50(2): 219-224.
25. ESTEVE-ZARZOSO, C., BELLOCH, C., URUBURU, F. y QUEROL, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP análisis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49(1): 329-337.
26. ESTEVE-ZARZOSO, B., GOSTÍN CAR, A., BOBET, R., URUBURU, F., y QUEROL, A. 2000. Selection and characterization of wine yeasts isolated from 'El Penedès' area (Spain). *Food Microbiology* 17(5): 553-562.
27. FELDMANN, H. 2001. Yeast molecular biology. Introduction - Yeast as a versatile model system: Yeast history. Adolf Butenandt Institute, University of Munich, Germany. [en línea] <[http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast\\_Biology/01\\_Introduction.htm](http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biology/01_Introduction.htm)> [consulta: 22 junio 2002].
28. FERNÁNDEZ, M.T., UBEDA, J.F. y BRIONES, A.I. 1999. Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of must in fermentation, by fisiological and molecular methods. *FEMS Microbiology Letters* 173(1): 223-229.
29. FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T., LÓPEZ, V., RAMÓN, D., BARTRA, E. y QUEROL, A. 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology* 70: 1-10.
30. FISCHER, G., JAMES, S.A., ROBERTS, I.N., OLIVER, S.G. y LOUIS, E.J. 2000. Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature* 405: 451-454.
31. FREZIER, V. y DUBOURDIEU, D. 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *American Journal of Enology and Viticulture*. 43(4): 375-380.

- 
32. GÓMEZ, B. [s.a.] Historia del vino: La vid y el vino a través de la historia. [en línea] <<http://www.masdevinos.com/historia.cfm>> [consulta: 26 junio 2002].
33. GONZÁLEZ, A. y VALENZUELA, L. 2002. Eucariontes: *Saccharomyces cerevisiae*. En: Microbios en línea. [en línea] Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. <<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>> [consulta: 08 julio 2002].
34. GRIMMER, J.F. 2001. StatBoxPro versión 5.0 [en línea] <<http://www.grimmersoft.com/us/index.htm>> [consulta: 15 agosto 2001].
35. GUILLAMÓN, J.M., QUEROL, A., JIMÉNEZ, M. y HUERTA, T. 1993. Phylogenetic relationships among wine yeast strains based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *International Journal of Food Microbiology* 18: 115-125.
36. GUILLAMÓN, J.M., BARRIO, E., HUERTA T. y QUEROL, A. 1994. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44(4): 708-714.
37. GUILLAMÓN, J.M., BARRIO, E. y QUEROL, A. 1996. Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationship between genetic distance and geographic or ecological origin. *Systematic and Applied Microbiology* 19: 122-132.
38. HAUSER, N., FELLEBERG, K., GIL, R., BASTUCK, S., HOHEISEL, J. y PÉREZ-ORTÍN, J. 2001. Whole genome análisis of a wine yeast strain. *Comparative and Funcional Genomics* 2: 69-79.
39. HILLIS, D.M. y MORITZ, C. (Eds.). 1990. *Analysis: Phylogeny reconstruction*. En: *Molecular systematics*. Sunderland, Massachusetts, USA. Sinauer Associates, Inc. pp. 422-424.

40. IBEAS, J.I. y JIMÉNEZ, J. 1996. Genomic complexity and chromosomal rearrangements in wine-laboratory yeast hybrids. *Current Genetics* 30: 410-416.
41. IBEAS, J.I. y JIMÉNEZ, J. 1997. Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces* flor yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 63(1): 7-12.
42. IZQUIERDO, P.M., BRIONES, A.I. y UBEDA, J.F. 1996. Relationship between the chromosomal profile and the whole-cell protein patterns of wine yeast strains. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie* 29(8): 738-742.
43. IZQUIERDO, P.M., UBEDA, J.F. y BRIONES, A.I. 1997. Study of the karyotype of wine yeasts strains isolates in the region of Valdepenas in two consecutive vintages. *Food Microbiology* 14: 221-225.
44. KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B. y NEI, M. 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software version 2.1, Bioinformatics (submitted). [en línea] Arizona State University, Tempe, Arizona, USA. <<http://www.megasoftware.net/>> [en consulta: 15 agosto 2001].
45. LALLEMAND. Lalvin EC-1118 information. [en línea] <<http://consumer.lallemmand.com/danstar-lalvin/ec1118.html>> [consulta: 27 agosto 2002].
46. LIN, A.W., USERA, M.A., BARRETT, T.J., y GOLDSBY, R.A. 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Clinical Microbiology* 34(4): 870-876.
47. LONGO, E., CANSADO, J., AGRELO D. y VILLA, T. 1991. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture* 42: 141-144.

48. LONGO, E. y VEZINHET, F. 1993. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 59(1): 322-326.
49. MÄNTYNEN, V. 1999. Methods for studying phylogenetic relationships: Numerical taxonomy. En: Detection, quantification and characterization of food related microorganisms using molecular and physiological methods. [en línea] Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Finland. Academic dissertation, June 1999.  
<<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/mantynen/detectio.html>>  
[consulta: 22 abril 2002].
50. MARICONDA, L., ARCUCCI, G., MÉNDEZ, P., ZAJONSKOVSKY, I., SANGORRÍN, M. y CABALLERO, A. 2002 Yeast microbiota associated to winery equipment. (Resumen). *Biocell* 26(1), 186.
51. MELERO, R. 1992. Fermentación controlada y selección de levaduras vínicas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 32(4): 371-379.
52. MESAS, J.M. y ALEGRE, M.T. 1999. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 2(4): 174-183.
53. NADAL, D., COLOMER, B., y PIÑA, B. 1996. Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 62(6): 1944-1950.
54. NADAL, D., CARRO, D., FERNÁNDEZ-LARREA, J. y PIÑA, B. 1999. Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65(4): 1688-1695.
55. OXOID. Products: Lysine medium. [en línea]  
<<http://www.oxid.com/uk/index.asp?mpage=iproductdetail&pre=CM0191&l=EN&x=>>> [consulta: 27 agosto 2002].

- 
56. PARRISH, M.E. y CARROLL, D.E. 1985. Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture* 36: 165-169.
57. PASTEUR, L. 1879. Scientific papers. [en línea] The Harvard classics. April 25, 2001 by Bartleby.com. Vol. XXXVIII, Part 7. Elliot, C.W. (Ed.). New York, P.F. Collier & Son. <<http://www.bartleby.com/38/7/>> [consulta: 22 junio 2002].
58. PÉREZ, M.A., GALLEGO, F.J. y HIDALGO, P. 2001. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiology Letters* 205(2): 375-378.
59. PÉREZ-ORTÍN, J., QUEROL, A., PUIG, S. y BARRIO, E. 2002. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in a adaptative evolution of yeast strains. *Genome Research* 12(10): 1533-1539.
60. POVHE JEMEC, K., CADEZ, N., ZARGORC, T., BUBIC, V., ZUPEC, A. y RASPOR, P. 2001. Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiology* 18(3): 247-259.
61. PUIG, S., QUEROL, A., BARRIO, E. y PÉREZ-ORTÍN, J.E. 2000. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5): 2057-2061.
62. QUEROL, A., BARRIO, E. y RAMÓN, D. 1992a. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 439-446.
63. QUEROL, A., BARRIO, E., HUERTA, T. y RAMON, D. 1992b. Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wine: selection and DNA patterns. *Journal of Food Science* 57(1): 183-185.

64. QUEROL, A., BARRIO, E. HUERTA, T. y RAMÓN, D. 1992c. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 58(9): 2948-2953.
65. QUEROL, A. 2000. Modificación genética de levaduras vínicas. [en línea] *ACE Revista de Enología* 52: 16-19 <[http://www.acenologia.com/ciencia52\\_2.htm](http://www.acenologia.com/ciencia52_2.htm)> [consulta: 30 julio 2002].
66. RIVEROS, F., MUÑOZ, G., GONZÁLEZ, L., ROJAS, L., ÁLVAREZ, M. y HINRICHSEN, P. 2001. Comparación entre análisis morfológicos y de ADN para la identificación de especies de *fusarium* aislados de melón (*Cucumis melo* L.). [en línea] *Agricultura técnica* 61 (3), pp. 281-293 <<http://www.inia.cl/at/espanol/v61n3/AT04.htm>> [consulta: 13 junio 2002].
67. RUNDLE, H., NAGEL, L., WENRICK-BOUGHMAN, J. y SCHLUTER, D. 2000. Natural selection and parallel speciation in sympatric sticklebacks. *Science* 287(5451): 306-308.
68. SAID, A., LOYOLA, E. y PRIETO, C. 1999. Aislamiento y caracterización de cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* del valle de Casablanca (Chile). *Boletín Micológico* 14(1-2): 57-65.
69. SABATE, J., CANO, J., ESTEVE-ZARZOSO, B. y GUILLAMÓN, J.M. 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial. *Microbiological Research* 157(4): 1-8.
70. SCHÜTZ, M. y GAFNER, J. 1994. Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology* 19: 253-257.
71. SCHWARTZ, D. y CANTOR, C. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37(1): 67-75.

72. SÖLL, D. 2000. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 13(2): 332-370.
73. VERAMONTE. [s.a.] Chile: Una breve historia del vino. [en línea] <<http://www.veramonte.cl/chile.html>> [consulta: 26 junio 2002].
74. VERSAUAUD, A., COURCOUX, P., ROULLAND, C., DULAU, L. y HALLET, J.N. 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Applied and Environmental Microbiology* 61(10): 3521-3529.
75. VEZINHET, F., BLONDIN, B. y HALLET, J.N. 1990. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32: 568-571.
76. VEZINHET, F., HALLET, J.N., VALADE, M. y POULARD, A. 1992. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *American Journal of Enology and Viticulture* 43: 83-86.
77. VINOS DE ARGENTINA. 1999. La historia del vino: La vitivinicultura en América. [en línea] <<http://www.vinosdeargentina.com/menu.php?codigo=1>> [consulta: 01 julio 2002].
78. WANG, G., VAN DAM, A.P., SPANJAARD, L., y DANKERT, J. 1998. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 36(3): 768-776.
79. ZOLAN, M.E. 1995. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiological Reviews* 59(4): 686-698.

**ANEXOS**

## ANEXO 1: Soluciones y medios

### 1. Medio YPD

Extracto de levadura	0,5 %
Peptona	0,5 %
Glucosa	2,0 %
Agar*	2,0 %
Estreptomicina*	200 µg/mL

Llevar al volumen final con agua destilada y autoclavar 15 min a 121 °C.

\*Sólo para preparar medio sólido.

### 2. Medio YM

Extracto de levadura	0,3 %
Extracto de malta	0,3 %
Glucosa	1,0 %
Peptona	0,5 %
Agar*	2,0 %
Ampicilina*	100 µg/mL

Llevar al volumen final con agua destilada y autoclavar 15 min a 121 °C.

\*Sólo para preparar medio sólido.

### 3. Medio Lisina (Oxoid)

Glucosa	44,5	g/L
Fosfato de potasio dihidrógeno	1,78	g/L
Sulfato de magnesio	0,89	g/L
Cloruro de calcio fundido	0,178	g/L
Cloruro de sodio	89	mg/L
Adenina	1,78	mg/L
DL-metionina	0,891	mg/L
L-histidina	0,891	mg/L
DL-triptofano	0,891	mg/L

Ácido bórico	8,9	µg/L
Sulfato de zinc	35,6	µg/L
Molibdato de amonio	17,8	µg/L
Sulfato de manganeso	35,6	µg/L
Sulfato ferroso	222,5	µg/L
Lisina	1,0	g/L
Inositol	0,02	g/L
Pantotenato de calcio	2	mg/L
Aneurina	0,4	mg/L
Piridoxina	0,4	mg/L
Ácido p-aminobenzoico	0,2	mg/L
Ácido nicotínico	0,4	mg/L
Riboflavina	0,2	mg/L
Biotina	2	µg/L
Ácido fólico	1	µg/L
Agar	17,8	g/L

Resuspender 6,6 g del medio lisina en 100 mL de agua destilada. Llevar a ebullición agitando frecuentemente para disolver todo y evitar el sobrecalentamiento. Enfriar y dispensar en placas de Petri.

#### 4. TBE 5x (solución madre)

Trisma Base	445 mM
Ácido Bórico	445 mM
EDTA pH 8,0	10 mM

Llevar al volumen final con agua destilada.

#### 5. EDTA 0.5 M pH 8.0

Disodioetilendiamintetraacetato · 2H <sub>2</sub> O	186,1 g
Hidróxido de sodio en lentejas	± 20 g

Agregar al EDTA 800 mL de agua destilada y llevar a pH 8,0 con las lentejas de hidróxido de sodio agitando constantemente con un magneto (a medida que vaya alcanzando el pH se va disolviendo el EDTA). Ajustar a 1 L con agua destilada y autoclavar 15 min por 121 °C.

**6. TE pH 7,4**

Tris-HCl pH 7,4	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

Llevar al volumen final con agua destilada.

**7. NDS**

EDTA 0,5 M pH 8,0	50 mL
N-laurosilsarcosina	5 g
Tris-HCl 1 M pH 7,4	5 mL

Llevar a 500 mL con agua destilada.

**8. LET**

Trisma Base	0,375 g
$\beta$ -mercaptoetanol	18,75 mL

Llevar a 250 mL con EDTA 0,5 M pH 8,0  
"Usar bajo campana con guantes"

**9. Solución de Tinción de Bromuro de Etidio (0,5  $\mu$ g/mL)**

Bromuro de etidio (5 mg/mL)	100 $\mu$ L
Agua destilada	1 L

"Usar guantes y manipular con cuidado. Reactivo mutagénico"

**10. GLD 6x**

Glicerol	35 %
Ficoll	2 %
Azul de bromofenol	0.25 %
Tris-Borato	6 x